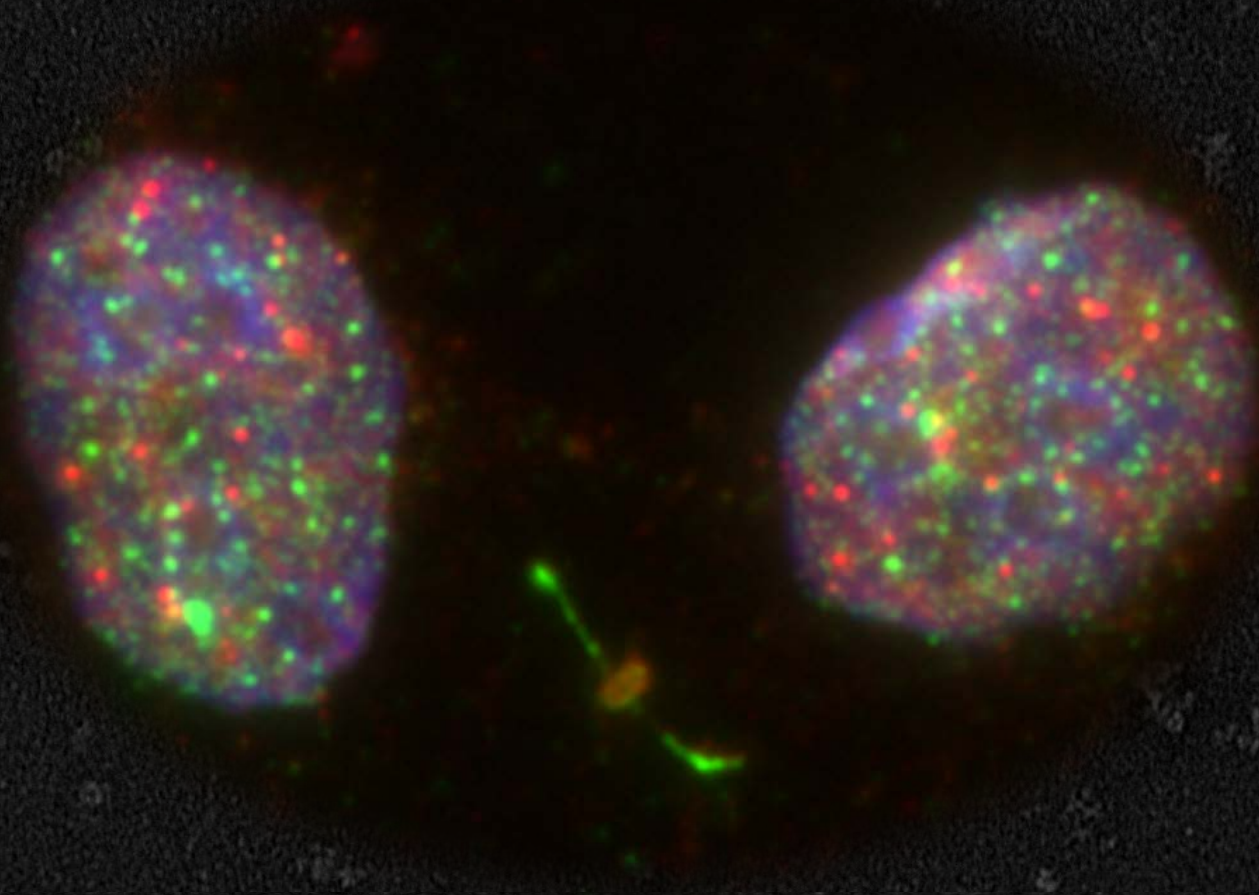


# Mecanismos Moleculares de Acción de la Proteína 53BP1 en la Respuesta al Daño en el ADN



**Tesis Doctoral**

**Juan-Luis Rodríguez Barbancho**



Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**Madrid  
2013**











#### Imagen de Portada:

**Tinción inmunofluorescente de las proteínas 53BP1 y RPA en dos células U2OS hermanas.** 53BP1 (en verde) aparece formando focos nucleares en las roturas de doble cadena (DSBs) del ADN, pero además también forma las dos ramas de un puente de 53BP1-RPA (53RB) que conecta los núcleos (teñidos con DAPI, azul) de dos células hijas en separación aparentemente independientes. RPA (en rojo), proteína de unión a ADN de cadena sencilla, se localiza en la zona central del puente de 53BP1-RPA. De fondo, puede apreciarse la unión *in vitro* al ADN de la región IRIF de 53BP1, en una imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

# **Mecanismos Moleculares de Acción de la Proteína 53BP1 en la Respuesta al Daño en el ADN**

**Tesis Doctoral**

Juan-Luis Rodríguez Barbancho

Madrid

Octubre de 2013



Memoria presentada por **Juan-Luis Rodríguez Barbancho**, Licenciado en Bioquímica, para optar al grado de **Doctor en Ciencias** por la **Universidad Autónoma de Madrid**.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el **Grupo de Inestabilidad Genómica, Programa de Oncología Molecular**, del **Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)**, Madrid, bajo la dirección del **Dr. Óscar Fernández-Capetillo Ruiz**.

Para su realización se ha contado con la financiación del **Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU)** del **Ministerio de Economía y Competitividad**.





*“There is no knowledge  
that is not power.”*

— Ralph Waldo Emerson



*A mi padre, mi madre y mi hermana*



## AGRADECIMIENTOS

Esta primera sección está dedicada a dar las gracias a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a mi formación tanto científica como personal a lo largo de los años de desarrollo de la presente tesis doctoral.

En primer lugar, debo de agradecer a Óscar Fernández-Capetillo, mi Director de tesis, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo en su grupo de investigación, así como por su labor como mentor y jefe, aportando en todo momento enseñanzas, conocimientos, ideas y proyectos. También he de agradecerle la motivación, apoyo, comprensión y paciencia prestados no sólo en el plano científico, sino también en lo personal.

Del mismo modo, quisiera dar las gracias a todos los miembros de mi laboratorio, el Grupo de Inestabilidad Genómica del Programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Su ayuda profesional, su compañerismo, su calidad humana y el haberme acogido en el grupo como un miembro más de una gran familia han resultado críticos para el desarrollo de este trabajo. A los antiguos miembros del laboratorio corresponde agradecer las enseñanzas recibidas y la huella que dejaron: Alexandra Brás, Myriam Cuadrado, Paula Gutiérrez, Eva López, Bárbara Martínez, María del Mar de Miguel, Ángela Monasor, María Fernanda Montaña, Rebeca Soria, Luis Ignacio Toledo y Rafał Żur. Y a los miembros actuales, su apoyo incondicional y la increíble labor que vienen realizando, para que también quede ello reflejado en las nuevas generaciones: Marta Elena Antón, Ariana Jacome, Emilio Lecona, Andrés Joaquín López, Cristina Mayor, Isabel Morgado, Matilde Murga, María Nieto, Sara Rodrigo, Sergio Ruiz, Federica Schiavoni, Julia Specks y Enrico Tenaglia.

Merecen también un agradecimiento destacado nuestros colaboradores en el desarrollo de estos proyectos de investigación, quienes han contribuido especialmente en ciertas partes experimentales: Ana Rojas, del Grupo de Biología Celular Computacional, Instituto de Medicina Predictiva y Personalizada del Cáncer (IMPCC), Badalona; Santiago Ramón, del Grupo de Bases Estructurales de la Integridad Genómica, CNIO; Juan Méndez y Tomás Aparicio, del Grupo de Replicación de ADN, CNIO; y Jiri Lukas, Claudia Lukas y Christoffel Dinant, del *Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research*, Copenhagen, Dinamarca.

Gracias igualmente a todo el personal del CNIO, tanto científico de los grupos y unidades de investigación como de servicios, pues directa o indirectamente, con su labor, han contribuido al buen término de nuestras investigaciones.

Quisiera hacer mención de forma personal a todos mis amigos, especialmente a Fran, Elena, Emi y Mauri. Han estado al tanto en todo momento de cuanto me ha acontecido y de mi evolución científica y personal, siendo partícipes de mis sentimientos, alegrías y tristezas. Me han brindado su apoyo incondicional y me han comprendido siempre, recargando mi motivación y animándome a seguir adelante. Gracias por ser los mejores amigos que se puede tener.

Por último, pero no menos importante, he de dar las gracias de forma muy especial a mi familia: Mi padre Juan de la Cruz, mi madre Luisa y mi hermana Alicia. Ellos son quienes siempre han estado, están y estarán ahí. Fuente de lo que soy, motivo de mi inspiración y el impulso que me hace seguir adelante. Nada de esto hubiera sido posible sin ellos.

A todos, ¡muchas gracias por haberlo hecho posible!

*Juan-Luis R.B.*

Madrid, 1 de octubre de 2013.



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. La respuesta al daño en el ADN (DDR).....</b>	<b>7</b>
1.1. Características generales .....	7
1.2. Activación y mecanismo molecular de la DDR.....	7
<b>2. Rutas de señalización principales de la DDR.....</b>	<b>9</b>
2.1. Rutas de fosforilación por las PIKKs.....	9
2.2. Ruta de ubiquitinación por RNF8 y RNF168.....	10
2.3. Rutas de sumoilación .....	12
2.4. Otras rutas de señalización.....	12
<b>3. Efectos de la DDR .....</b>	<b>12</b>
3.1. Reparación del ADN .....	13
3.2. Parada del ciclo celular.....	19
3.3. Senescencia celular (replicativa).....	22
3.4. Apoptosis.....	23
3.5. Diferenciación celular.....	24
<b>4. La DDR en el contexto de la cromatina .....</b>	<b>24</b>
4.1. Organización del material genético en forma de cromatina.....	24
4.2. El “código de histonas” de la reparación del ADN.....	25
4.3. Remodelación de cromatina en la DDR .....	29
4.4. Impacto de la compactación de la cromatina en la DDR .....	30
4.5. Formación de focos por las proteínas de la DDR.....	32
<b>5. 53BP1: Una proteína mediadora en la DDR .....</b>	<b>33</b>
5.1. Características generales .....	33
5.2. Ruta de señalización para el reclutamiento y regulación de 53BP1 .....	33
5.3. Funciones biológicas de 53BP1 .....	34
5.4. Arquitectura molecular en dominios de 53BP1 .....	38
5.5. Formación de focos de 53BP1: <i>Modelo clásico</i> .....	41
5.6. Inconsistencias y necesidad de revisión del <i>modelo clásico</i> .....	42

<b>6. Relaciones entre la DDR y la citocinesis.....</b>	<b>43</b>
6.1. La DDR en mitosis.....	43
6.2. Citocinesis.....	46
6.3. El <i>midbody</i> : Una estructura asociada a abscisión citocinética.....	49
6.4. Aurora B (AURKB) en mitosis y citocinesis.....	50
6.5. <i>Checkpoint</i> de abscisión citocinética (“ <i>Checkpoint NoCut</i> ”).....	51
6.6. Evidencias de relaciones entre la DDR, la mitosis y la citocinesis.....	54
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. Estrategias de clonaje.....</b>	<b>63</b>
1.1. Material de partida.....	63
1.2. Construcciones génicas etiquetadas con marcaje fluorescente.....	64
1.3. Construcciones génicas etiquetadas para purificación de proteínas.....	65
1.4. Construcciones retrovirales de MSH6.....	65
1.5. Construcciones virales de endonucleasas mitóticas con dominio MIT.....	65
<b>2. Biología Celular.....</b>	<b>66</b>
2.1. Líneas celulares y cultivo celular.....	66
2.2. Transfecciones transitorias.....	67
2.3. Infecciones virales y generación de líneas celulares.....	68
2.4. Interferencia de ARN (RNAi).....	69
2.5. Sincronización celular.....	70
2.6. Tratamientos farmacológicos.....	71
<b>3. Tinciones inmunofluorescentes.....</b>	<b>72</b>
3.1. Inmunofluorescencia convencional (“ <i>Protocolo de Thomas Jenuwein</i> ”).....	72
3.2. Inmunofluorescencia con pre-extracción.....	72
3.3. Tinción inmunofluorescente de puentes de 53BP1-RPA (53RBs).....	73
3.4. Inmunofluorescencia de proteínas cinetocóricas.....	73
3.5. Inmunofluorescencia de alto rendimiento (HTM).....	74
3.6. Inmuno-cenFISH.....	74
3.7. Tinción fluorescente de citoplasma y núcleo.....	75
3.8. Tinción de ssDNA por etiquetado nativo con BrdU.....	75
3.9. Etiquetado con EdU para HTM.....	76
3.10. Anticuerpos primarios usados para inmunofluorescencia.....	77
3.11. Anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia.....	77
<b>4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....</b>	<b>78</b>
4.1. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	78
4.2. Extracción de proteínas bacterianas.....	78
4.3. Purificación de proteínas recombinantes.....	78
4.4. Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE).....	79
4.5. Filtración en gel con sistema FPLC.....	80
<b>5. Análisis de proteínas.....</b>	<b>80</b>

5.1. Extracción de proteínas celulares.....	80
5.2. Fraccionamiento de cromatina.....	81
5.3. <i>Western blotting</i> .....	81
5.4. Dinámica de unión a la cromatina por FRAP.....	83
5.5. Ensayo de unión a ADN (EMSA).....	84
<b>6. Análisis de ARN .....</b>	<b>85</b>
6.1. Extracción de ARN .....	85
6.2. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	85
<b>7. Ensayos funcionales <i>in vivo</i> .....</b>	<b>85</b>
7.1. Ensayo de formación de focos inducidos por radiación ionizante (IRIF) .....	85
7.2. Ensayo de reclutamiento láser .....	86
7.3. Ensayo de apoptosis inducida por cisplatino.....	86
7.4. Ensayo de inestabilidad de microsatélites (MSI).....	86
<b>8. Análisis de ciclo celular y proliferación.....</b>	<b>87</b>
8.1. Etiquetado con EdU para HTM.....	87
8.2. Tinción con PI para FACS .....	87
<b>9. Microscopía óptica .....</b>	<b>88</b>
9.1. Microscopía de fluorescencia convencional .....	88
9.2. Microscopía confocal .....	88
9.3. Microscopía confocal de súper-resolución (STED).....	88
9.4. Microscopía de alto rendimiento (HTM).....	89
<b>10. Microscopía electrónica .....</b>	<b>89</b>
<b>11. Análisis bioinformático.....</b>	<b>90</b>
11.1. Proteínas y dominios de la DDR.....	90
11.2. Búsqueda de nuevos dominios proteicos.....	90
11.3. Búsqueda de residuos conservados en proteínas .....	90
<b>12. Análisis de datos .....</b>	<b>90</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
<b><u>PARTE I: Estudio del mecanismo de reclutamiento de 53BP1</u></b>	
<b>    a las roturas de doble cadena del ADN .....</b>	<b>95</b>
<b>1. Revisión del <i>modelo clásico</i> de formación de focos de 53BP1 .....</b>	<b>95</b>
1.1. Los focos de 53BP1 son ineficientes en ausencia de H4K20me <sub>2</sub> .....	96
1.2. 53BP1 está constitutivamente unida a la cromatina sólo en presencia de H4K20me <sub>2</sub> .....	97
1.3. El dominio Tudor de 53BP1 no es reclutado a las DSBs.....	99
1.4. Los focos de 53BP1 se forman, pero son ineficientes, en ausencia de su dominio Tudor .....	99
1.5. Diferente dinámica de unión de 53BP1 en la cromatina a en los focos.....	101
1.6. Proposición de un nuevo modelo de formación de focos de 53BP1 .....	102
<b>2. Verificación de <i>nuestro modelo</i> de formación de focos de 53BP1 .....</b>	<b>104</b>

2.1. Estrategia de verificación .....	104
2.2. Ciertos dominios de unión a histonas metiladas rescatan parcialmente la función de Tudor en la formación de focos de 53BP1 .....	105
2.3. Ciertos dominios de unión a histonas metiladas mantienen a 53BP1 unida constitutivamente a la cromatina.....	108
2.4. Otros dominios de unión inespecífica a cromatina no rescatan la formación de focos de 53BP1 .....	110
2.5. Otros dominios de unión inespecífica a cromatina son capaces de mantener a 53BP1 localizada en ésta .....	113
<b>3. Extensión del modelo a otras proteínas y dominios de la DDR:</b>	
<b>MSH6 y su dominio PWWP .....</b>	<b>114</b>
3.1. Análisis bioinformático de dominios hiperrepresentados en la DDR .....	114
3.2. El dominio PWWP de MSH6 ayuda a su función .....	115
3.3. Las células desprovistas de H4K20me <sub>2</sub> presentan MMR defectuoso .....	117
3.4. H4K20me <sub>2</sub> mantiene la localización cromatínica de MSH6.....	120
3.5. Dificultades y problemas en el análisis funcional del dominio PWWP de MSH6 .....	121
<b>4. Estudio de la unión de 53BP1 al ADN .....</b>	<b>121</b>
4.1. Búsqueda de una nueva región formadora de focos en 53BP1.....	121
4.2. Producción y purificación de proteínas recombinantes .....	126
4.3. La región HOD–SSDB de 53BP1 no se une por sí sola al ADN.....	126
4.4. La región IRIF de 53BP1 se une al ADN.....	128
4.5. El mutante IRIF <sup>D152IR</sup> del dominio Tudor pierde la unión al ADN .....	131
<b>PARTE II: Identificación y caracterización de una respuesta</b>	
<b>al daño en el ADN asociada a citocinesis.....</b>	<b>133</b>
<b>1. Identificación de una DDR activa en el <i>midbody</i> .....</b>	<b>133</b>
1.1. Una DDR activada se localiza en el <i>midbody</i> : La mDDR.....	133
1.2. Los <i>midbodies</i> tienden a contener ADN .....	137
1.3. El <i>midbody</i> se ve afectado por tratamientos farmacológicos que inducen inestabilidad genómica.....	138
<b>2. Caracterización de los puentes de 53BP1-RPA (53RBs) como consecuencia de la mDDR.....</b>	<b>141</b>
2.1. Puentes de 53BP1-RPA (53RBs): Una nueva estructura celular entre dos células hijas ..	141
2.2. Los 53RBs se localizan siempre en <i>midbodies</i> persistentes.....	144
2.3. Los 53RBs tienden a contener puentes cromosómicos.....	145
2.4. Los 53RBs contienen ssDNA .....	147
2.5. Los 53RBs están restringidos a fase G1.....	148
2.6. Los 53RBs siempre se forman entre células que contienen cuerpos nucleares de 53BP1 (53BP1 NBs).....	148
2.7. La formación de 53RBs se induce por estrés replicativo leve.....	149
2.8. La formación de 53RBs se induce por la depleción de BLM.....	150
2.9. Los 53RBs son diferentes de los puentes cromosómicos inducidos por inhibidores de TOPO-II .....	151
2.10. Los 53RBs se originan principalmente por rotura de puentes cromosómicos.....	154

<b>3. Relación de la mDDR con la condensación cromosómica.....</b>	<b>160</b>
3.1. El reclutamiento de RPA al ADN hipercondensado podría ser el origen de los 53RBs..	161
3.2. Los <i>midbodies</i> podrían formarse en torno a remanentes de cromatina hipercondensada.....	163
3.3. La mDDR requiere una correcta condensación cromosómica.....	165
3.4. La segregación cromosómica requiere una correcta condensación cromosómica.....	167
<b>4. Interacciones entre la citocinesis y la DDR.....</b>	<b>170</b>
4.1. La inhibición anafásica de Aurora B, pero no de PLK1, dispara la DDR en la próxima fase G1.....	170
4.2. La mDDR depende de Aurora B y PLK1 .....	172
4.3. Puentes cromosómicos intracelulares conectan algunos binúcleos en células tetraploides .....	174
<b>5. Participación de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR .....</b>	<b>176</b>
5.1. Hipótesis sobre el papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR.....	176
5.2. La depleción de las endonucleasas de resolución mitóticas sobreactiva la mDDR y empeora la citocinesis .....	177
5.3. Estrategia para la concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el <i>midbody</i> .....	181
5.4. La concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el <i>midbody</i> disminuye la activación de la mDDR .....	183
5.5. La concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el <i>midbody</i> rescata la citocinesis sin activación de la mDDR .....	185
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>189</b>
<b>A) Mecanismo de reclutamiento de 53BP1     a las roturas de doble cadena del ADN .....</b>	<b>191</b>
<b>1. Mecanismo molecular del reclutamiento de 53BP1 a las DSBs.....</b>	<b>192</b>
1.1. Inconsistencias del <i>modelo clásico</i> de formación de focos de 53BP1.....	192
1.2. <i>Nuestro modelo</i> de formación de focos de 53BP1.....	193
1.3. Implicaciones de nuestro modelo.....	195
1.4. Debilidades de nuestro modelo.....	196
1.5. Otros modelos de formación de focos de 53BP1.....	198
<b>2. Dominios de unión genérica a cromatina .....</b>	<b>202</b>
2.1. ¿Existen los dominios de unión inespecífica a cromatina? .....	202
2.2. Dominios de unión a ARN como dominios de unión genérica a cromatina .....	205
2.3. Equivalencia funcional entre los dominios de unión genérica a cromatina.....	206
2.4. Función de los dominios de unión genérica a cromatina en la DDR y otros procesos relacionados con la cromatina.....	206
2.5. Elementos de reconocimiento para los dominios de unión genérica a cromatina.....	207
<b>3. Funcionamiento de MSH6 en la cromatina en el MMR .....</b>	<b>208</b>
3.1. Nuestro modelo para el funcionamiento de MSH6 en la cromatina en el MMR.....	208
3.2. ¿En qué medida es extensible a MSH6 el modelo de unión genérica a la cromatina? .....	210

3.3. Posibles futuros estudios sobre la unión genérica a la cromatina de MSH6.....	211
<b>4. Interacción de 53BP1 con el ADN .....</b>	<b>212</b>
4.1. Interacción de 53BP1 con el ADN <i>in vitro</i> .....	212
4.2. Estudios previos sobre la interacción de 53BP1 con el ADN.....	213
4.3. ¿Existe interacción de 53BP1 con el ADN <i>in vivo</i> ? .....	215
4.4. Importancia de la región SSDB de 53BP1 .....	215
4.5. Posibles futuros estudios sobre la interacción de 53BP1 con el ADN.....	216
<b>B) La respuesta al daño en el ADN asociada a citocinesis</b>	
<b>(DDR del <i>midbody</i>, mDDR).....</b>	<b>219</b>
<b>1. Mecanismo molecular de la mDDR .....</b>	<b>220</b>
1.1. Modelo de activación de la mDDR .....	220
1.2. Limitaciones de nuestro modelo de activación de la mDDR.....	221
1.3. Efectos de la alteración experimental de la mDDR .....	222
1.4. Importancia de la mDDR.....	224
1.5. Relación de Aurora B con la cromatina en la mDDR.....	225
<b>2. Puentes de 53BP1-RPA (53RBs).....</b>	<b>226</b>
2.1. Significado biológico de los 53RBs.....	226
2.2. Condiciones para la formación de 53RBs.....	229
2.3. Posibles funciones de 53BP1 en los 53RBs .....	229
2.4. Papel de la condensación cromosómica en la formación del <i>midbody</i> y de los 53RBs .....	230
2.5. Modelo sobre el origen del <i>midbody</i> y de los 53RBs.....	231
<b>3. Las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR.....</b>	<b>233</b>
3.1. Papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR.....	233
3.2. Estudios previos sobre el papel de las endonucleasas de resolución en la DDR.....	235
3.3. Regulación de las endonucleasas de resolución mitóticas .....	236
3.4. Estudios futuros sobre el papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR.....	237
<b>4. Investigaciones futuras sobre la mDDR.....</b>	<b>237</b>
4.1. Estudios <i>in vitro</i> de la mDDR.....	238
4.2. Estudios <i>in vivo</i> de la mDDR.....	238
4.3. Potencial terapéutico de la mDDR y aplicaciones biomédicas.....	238
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>239</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>243</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>265</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>277</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>281</b>



## RESUMEN

### ***Mecanismos moleculares de acción de la proteína 53BP1 en la respuesta al daño en el ADN***

La respuesta al daño en el ADN (DDR) es un proceso con un componente epigenético subyacente. Las roturas de doble cadena (DSBs) del ADN están enriquecidas en ciertas modificaciones postraduccionales de histonas, reconocidas por algunas proteínas de reparación del ADN a través de sus dominios de unión a cromatina.

Una de tales proteínas es 53BP1, la cual reconoce la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> a través de su dominio Tudor en tándem. Curiosamente, esta marca está presente a lo largo de toda la cromatina incluso sin daño en el ADN. El “modelo clásico” propuesto hasta ahora postula que 53BP1 se recluta a las DSBs por interacción directa con H4K20me<sub>2</sub> de forma específica y restringida al entorno de la lesión. Sin embargo, 53BP1 sigue reconociendo las lesiones incluso en ausencia de dicha marca epigenética o del dominio Tudor en tándem, si bien la proteína pierde su afinidad por la cromatina y el proceso es más ineficiente. Además, la función del dominio Tudor en tándem puede recuperarse por intercambio con otros dominios de unión genérica a cromatina no relacionados con la DDR. Esto nos lleva a proponer un nuevo modelo en el cual el reconocimiento de H4K20me<sub>2</sub> por el dominio Tudor en tándem de 53BP1 posibilita que la proteína se mantenga constitutivamente unida a la cromatina incluso en ausencia de daño en el ADN, lo que facilita su reconocimiento de las lesiones cuando éstas tienen lugar. Por otra parte, nuestros estudios bioinformáticos revelan que la presencia de dominios de unión a cromatina es una propiedad recurrente en las proteínas de la DDR, lo que permite extender nuestro modelo a otras proteínas de la DDR, como mostramos para el caso de MSH6 con su dominio PWWP en la reparación de apareamientos erróneos del ADN (MMR). Finalmente, estudios más detallados sobre la proteína 53BP1 nos permitieron desvelar su capacidad *in vitro* para unirse directamente al ADN, interacción que podría contribuir al mecanismo de su reclutamiento a las DSBs.

En un segundo proyecto, descubrimos que 53BP1 y otras proteínas de la DDR están presentes en el *midbody*, la estructura característica de citocinesis. Esta localización ocurre a lo largo de puentes cromosómicos de ADN mal segregado entre dos células hijas. Existe, por tanto, una DDR asociada a citocinesis a la que denominamos “DDR del *midbody*” (mDDR). Se identificó una nueva estructura citológica, los “puentes de 53BP1-RPA” (53RBs), como marcador de la activación de la mDDR, cuya frecuencia se ve incrementada en condiciones que generan estrés replicativo y, por lo tanto, problemas de segregación cromosómica. La mDDR depende de las kinasas mitóticas Aurora B y PLK1, y su función principal sería la de promover la resolución de los puentes cromosómicos a través de la activación de las endonucleasas de resolución (resolvasas) mitóticas MUS81 y GEN1, permitiendo así que se complete la abscisión citocinética con el mantenimiento de la integridad genómica.



---

**ABSTRACT*****Molecular mechanisms for the action of 53BP1 protein in the DNA damage response***

The DNA damage response (DDR) is a process with an underlying epigenetic component. DNA double-strand breaks (DSBs) are enriched in a variety of histone postranslational modifications, recognized by some DNA repair proteins through their chromatin-binding domains.

One of such proteins is 53BP1, which recognizes the epigenetic mark H4K20me<sub>2</sub> via its tandem Tudor domain. Strikingly, this mark is present in a chromatin-wide fashion irrespective of DNA damage. The currently accepted ‘classic model’ postulates that 53BP1 is recruited to DSBs by direct interaction with H4K20me<sub>2</sub> in a specific, lesion-confined manner. However, 53BP1 is still able to recognize lesions even in absence of such epigenetic mark or the tandem Tudor domain, though the protein loses its chromatin-affinity and the process is more inefficient. In addition, the function of the tandem Tudor domain can be recovered when interchanged with other non-DDR-related generic chromatin-binding domains. This leads us to propose a novel model wherein H4K20me<sub>2</sub> recognition by 53BP1 tandem Tudor domain allows a constitutive chromatin-binding even in the absence of DNA damage, what facilitates lesion recognition when it takes place. Moreover, our bioinformatic studies reveal that the presence of chromatin-binding domains is a recurrent property in DDR proteins, what enables our model to be extended to other DDR proteins, as shown for the case of MSH6 with its PWWP domain in DNA mismatch repair (MMR). Finally, further studies on 53BP1 protein allowed us to unveil its *in vitro* ability to directly bind DNA, interaction that could contribute to its DSB-recruitment mechanism.

In a second project, we discover that 53BP1 and other DDR proteins are present at the midbody, the hallmark structure of cytokinesis. This location occurs alongside chromosome bridges of missegregated DNA between two daughter cells. Therefore, there exists a cytokinesis-associated DDR that we termed ‘*midbody DDR*’ (mDDR). A new cytological structure, ‘*53BP1-RPA bridges*’ (53RBs), was identified as a marker of mDDR activation, whose frequency is increased in conditions which generate replication stress and, therefore, chromosome segregation problems. The mDDR depends on Aurora B and PLK1 mitotic protein kinases, and its main function would be to promote chromosome bridges resolution by means of the activation of the mitotic resolution endonucleases (resolvases) MUS81 and GEN1, thus ensuring the completion of cytokinetic abscission while maintaining genome integrity.





# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

## 1. La respuesta al daño en el ADN (DDR)

### 1.1. Características generales

La célula se halla continuamente expuesta a diversas fuentes, tanto externas como internas, causantes de daño en su material genético, el ADN. Ésta es la génesis de las mutaciones, principal motor de la evolución, fuerza que sin embargo ha de verse contrarrestada por la preservación de las funciones celulares básicas y la correcta transferencia del material genético a la descendencia.

Para prevenir la propagación de mutaciones que podrían conducir a inestabilidad genómica y, en el caso de los organismos superiores, cáncer, es vital que el daño en el ADN sea detectado y reparado antes de la replicación del ADN y la división celular. Esto es facilitado por una cascada de transducción de señales conocida como la respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés *DNA damage response*) (Kastan y Bartek, 2004; Harper y Elledge, 2007; Ciccia y Elledge, 2010), la cual inicia procesos tales como la reparación del ADN, parada del ciclo celular (en sus denominados puntos de control o *checkpoints*), apoptosis y senescencia celular, así como regulación de la transcripción y la replicación, todos ellos mecanismos diseñados para proteger la integridad del genoma (Kastan y Bartek, 2004; d'Adda di Fagagna, 2008).

Más aún, la DDR es un participante integral de la supresión tumoral y muchas células tumorales muestran pérdidas de sus componentes funcionales (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; O'Driscoll y Jeggo, 2006; Bartkova *et al.*, 2007). Así pues, un profundo conocimiento de la DDR resultaría vital para la comprensión y el tratamiento de muchos tumores. No resulta extraño, por tanto, que en los últimos años el estudio de los mecanismos moleculares y procesos celulares subyacentes a la DDR sea uno de los campos más prolíficos en la investigación biomédica básica, sin contar con el intrínseco valor académico que este conocimiento representa para la Biología Molecular y Celular.

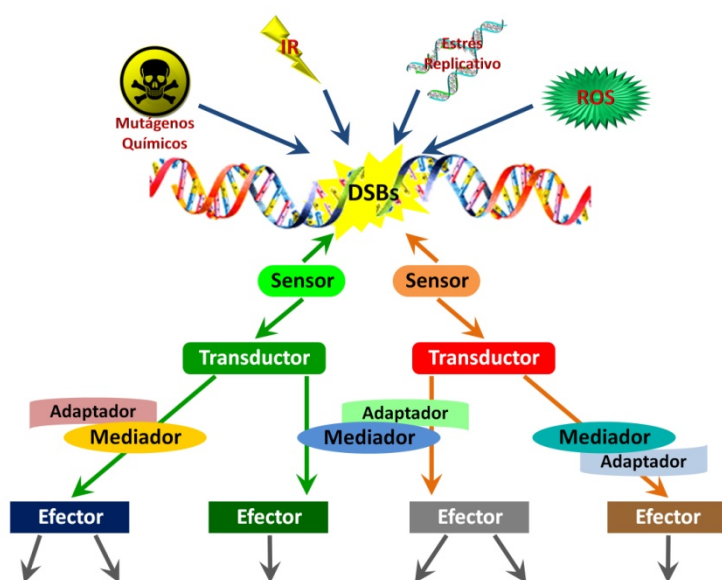
### 1.2. Activación y mecanismo molecular de la DDR

Una de las lesiones del ADN más deletéreas para la célula son las roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *double-strand breaks*), que pueden ser causadas por un amplio rango de agentes genotóxicos. Los exógenos pueden ser de tipo físico, principalmente radiación ionizante (IR, *ionizing radiation*) X y  $\gamma$  (Hoeijmakers, 2001); químico, dado por mutágenos radiomiméticos como la neocarzinostatina e inhibidores de topoisomerasas I y II (d'Arpa *et al.*, 1990); o biológico, representado por productos del

metabolismo oxidativo endógeno, como las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) (de Bont y van Larebeke, 2004). Los agentes endógenos vienen dados por la propia replicación del ADN, en el denominado estrés replicativo, cuyo origen fundamental es una acumulación de ADN de cadena sencilla (ssDNA, *single-stranded DNA*), de alto potencial recombinogénico (Paulsen y Cimprich, 2007). Por otra parte, existen también fenómenos de daño programado en los que se introducen DSBs de forma fisiológica y controlada por la célula, como ocurre en la recombinación entre cromosomas homólogos que tiene lugar en la meiosis, así como en los procesos de recombinación somática (recombinación V(D)J) y recombinación de cambio de clase (CSR, *class-switch recombination*) de las inmunoglobulinas que se dan en linfocitos.

En este sentido, se habla de la respuesta al daño en el ADN ante roturas de doble cadena y de la respuesta a estrés replicativo como las principales vías de activación de la DDR, aunque existen otras muchas respuestas y mecanismos de reparación desencadenados por diferentes tipos de lesiones.

Molecularmente, la DDR es ejecutada por un complejo sistema de señalización jerárquico y altamente diversificado capaz de activar de forma específica y ordenada diferentes grupos de proteínas para llevar a cabo cada una de las tareas requeridas por la célula (Shiloh, 2003) (Figura 1). Los componentes de la DDR se han clasificado jerárquicamente según sus diferentes funciones. En primer lugar, la lesión es detectada específicamente por los sensores, proteínas que reconocen ésta o las alteraciones de la cromatina que siguen a la rotura del ADN. Seguidamente, los extremos de la rotura



**Figura 1 | Jerarquización de los componentes de la respuesta al daño en el ADN (DDR).** Diferentes tipos de lesiones son reconocidos por sensores específicos, que reclutan a los transductores. Éstos inician cascadas de señalización que se amplifican a través de los mediadores y adaptadores, llegando finalmente a gran cantidad de efectores responsables de las respuestas concretas. El esquema representa el caso de las roturas de doble cadena (DSBs), donde la respuesta es diferente según su origen sea exógeno o endógeno.

que han quedado libres muchas veces son procesados, ya que al tener una estructura aleatoria no sirven de sustrato para los mecanismos de reparación. A continuación, los sensores reclutan a los transductores de la señal, que se activan y transmitirán ésta a los efectores mediante una cascada de modificaciones postraduccionales de proteínas. En este paso se produce la amplificación de la señal mediante la activación de los mediadores (con actividad catalítica) y adaptadores (sin ella, sirviendo como plataformas de andamiaje), ya que un solo transductor, a través de diversas proteínas mediadoras y adaptadoras,

puede activar un gran número de efectores implicados en rutas de señalización diferentes. Los mediadores y adaptadores hacen así posible que la señal emitida desde la lesión sea transmitida a todo el núcleo. Los efectores serán finalmente las proteínas encargadas de ejecutar los procesos que requiere la DDR. Una vez reparado el daño, la señal ha de apagarse por reversión de los componentes de la DDR a su estado inactivo, posibilitando una nueva respuesta.

## 2. Rutas de señalización principales de la DDR

### 2.1. Rutas de fosforilación por las PIKKs

La ruta canónica de DDR (Figura 2) es activada por daño en el ADN, especialmente por la generación de DSBs o la acumulación de ssDNA en el denominado estrés replicativo. Ambas respuestas suponen rutas diferentes, aunque interconectadas en ciertos puntos. En cualquier caso, tienen en común la utilización de proteínas transductoras similares, las PIKKs (quinasas similares a la fosfatidilinositol-3-kinasa, *phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases*) (Falck *et al.*, 2005). Las PIKKs son serina/treonina kinasas cuyas dianas de fosforilación son cualquiera de estos residuos seguido por una glutamina (sitios [S/T]Q).

#### a) Respuesta a DSBs (Ruta de ATM y DNA-PKcs):

Una DSB es un daño altamente citotóxico que es detectado inmediatamente por las proteínas sensoras de la DDR, en este caso el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) [recombinación meiótica 11 (*meiotic recombination 11*)-Rad50-síndrome de rotura de Nijmegen 1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*)] y el heterodímero Ku70-Ku80. Éstas reclutan inmediatamente al sitio de la lesión a las proteínas transductoras, las PIKKs ATM (mutada en ataxia-telangiectasia, *ataxia-telangiectasia mutated*) y DNA-PKcs (subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de ADN, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) (Falck *et al.*, 2005).

Las PIKKs reclutadas se activan primero por autofosforilación, proceso en el que en concreto ATM pasa de su forma dimérica inactiva a forma monomérica activa. Seguidamente, fosforilan su diana principal, la histona H2AX, variante de H2A, en S<sup>139</sup>, dando lugar a H2AXS139p, modificación también conocida como  $\gamma$ H2AX. Los focos nucleares de  $\gamma$ H2AX son citológicamente visibles y se consideran un marcador distintivo de daño en el ADN. En el caso de DSBs,  $\gamma$ H2AX es reconocida por la proteína mediadora MDC1 (mediador del *checkpoint* de daño en el ADN 1, *mediator of DNA damage checkpoint 1*), que se une a ella a través de sus dominios BRCT (Stucki y Jackson, 2006). MDC1 amplifica la señal de la DDR mediante el reclutamiento de más complejos MRN-ATM al sitio del daño (Stucki *et al.*, 2005).

Finalmente, la actividad sostenida de ATM fosforila, entre otros muchos sustratos, a la kinasa efectora CHK2 (kinasa de *checkpoint 2*, *checkpoint kinase 2*), lo cual conduce a la regulación dependiente de fosforilación de efectores que incluyen las proteínas de la familia CDC25 y p53 (Bartek y Lukas, 2003), que regulan los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular y la entrada en apoptosis, respectivamente.

### **b) Respuesta a estrés replicativo (Ruta de ATR):**

El ssDNA que se acumula durante fallos en la replicación se recubre por la proteína sensora RPA (proteína de replicación A, *replication protein A*), que recluta a otra proteína transductora miembro de la familia PIKK, la kinasa ATR (relacionada con ATM y Rad3, *ATM- and Rad3-related*), a través de la interacción con su cofactor ATRIP (Falck *et al.*, 2005). En esta primera activación, ATR se autofosforila. ATRIP dirige a su vez al complejo RAD17-RFC (RAD17-RFC2-5), que carga al complejo 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1) al ADN bicatenario adyacente al ssDNA cubierto por RPA. Esto recluta localmente a TOPBP1, a través de una interacción entre dos dominios BRCT de TOPBP1 y la cola C-terminal fosforilada de RAD9. TOPBP1 es un efector alostérico de ATR, que la activa aún más (Cimprich y Cortez, 2008).

En este caso, la actividad sostenida de ATR fosforila diversas proteínas, pero sólo gracias al adaptador específico Claspin puede fosforilarse la kinasa efectora principal, CHK1 (kinasa de *checkpoint 1*, *checkpoint kinase 1*), cuyas dianas también son proteínas de la familia CDC25 y p53 (Bartek y Lukas, 2003), con la consiguiente regulación de los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular y la apoptosis, respectivamente.

### **Diferencias funcionales entre ATM, ATR y DNA-PKcs:**

Cabe resaltar que ATM y DNA-PKcs se activan en respuesta a DSBs en todas las fases del ciclo celular (Gottlieb y Jackson, 1993; Pandita *et al.*, 2000), mientras que ATR es la responsable de señalar la aparición de ssDNA, estando su actividad restringida a las fases S y G2 (Zou y Elledge, 2003).

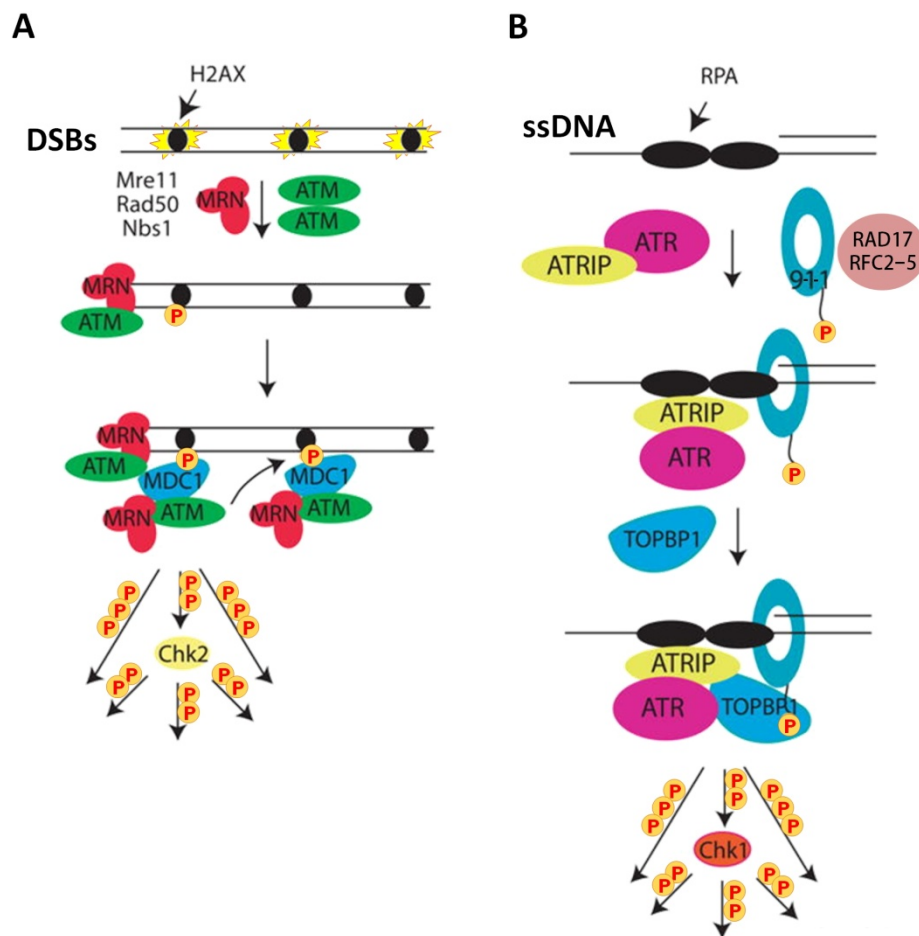
En condiciones normales, la actividad de DNA-PKcs está restringida a la zona de la lesión, y promueve fundamentalmente la reparación de la DSB (Collis *et al.*, 2005), a diferencia de ATM y ATR, que tienen un papel esencial en la señalización global del daño y son capaces de fosforilar *in vivo* a más de 700 sustratos conocidos de la DDR (Matsuoka *et al.*, 2007).

## **2.2. Ruta de ubiquitinación por RNF8 y RNF168**

Otra capa de la cascada de señalización viene dada por el reclutamiento ordenado de ciertas ubiquitina ligasas. MDC1, una vez fosforilado de forma dependiente de ATM, recluta entonces a la E3-

ubiquitina ligasa RNF8 (proteína con dedo RING 8, *RING-finger protein 8*) al sitio de la DSB (Huen *et al.*, 2007; Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007), donde interacciona con otra E3-ubiquitina ligasa, HERC2, que en su forma activada por ATM se une a RNF8 y facilita su interacción con la E2-ubiquitina conjugasa UBC13 (Bekker-Jensen *et al.*, 2010). De esta forma, gracias también a la mediación de la enzima E1-activadora de ubiquitina UBA1 (Moudry *et al.*, 2012b), RNF8 cataliza uno o más eventos de ubiquitinación, incluyendo la de K<sup>119</sup> de H2AX (H2AXK119ub) (Ikura *et al.*, 2007).

A continuación, otra E3-ubiquitina ligasa, RNF168, reconoce esta última marca y a su vez, asociándose a las E2-ubiquitina conjugasas RAD6A o RAD6B (Liu *et al.*, 2013), amplifica la señal de ubiquitinación, extendiendo la marca a otros sustratos aún en estudio (Doil *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009) y catalizando la generación de H2AK13ub<sub>1</sub> y H2AK15ub<sub>1</sub> (Lukas *et al.*, 2011; Jackson y Durocher, 2013). Esto promueve el reclutamiento y la retención en los sitios de rotura de proteínas mediadoras y adaptadoras, tales como 53BP1 (proteína de unión a p53 1, *p53-binding protein 1*) y la E3-ubiquitina ligasa BRCA1 (cáncer de mama 1, *breast cancer 1*) (Polo y Jackson, 2011), las cuales potenciarían la señalización de la DDR a través de otros mecanismos (Li y Zou, 2005).



**Figura 2 | Rutas de señalización principales de la DDR: Fosforilación por PIKKs. (A)** Ruta de ATM en respuesta a DSBs. **(B)** Ruta de ATR en respuesta a ssDNA generado por estrés replicativo. (Adaptado de Cimprich y Cortez, 2008.)

## 2.3. Rutas de sumoilación

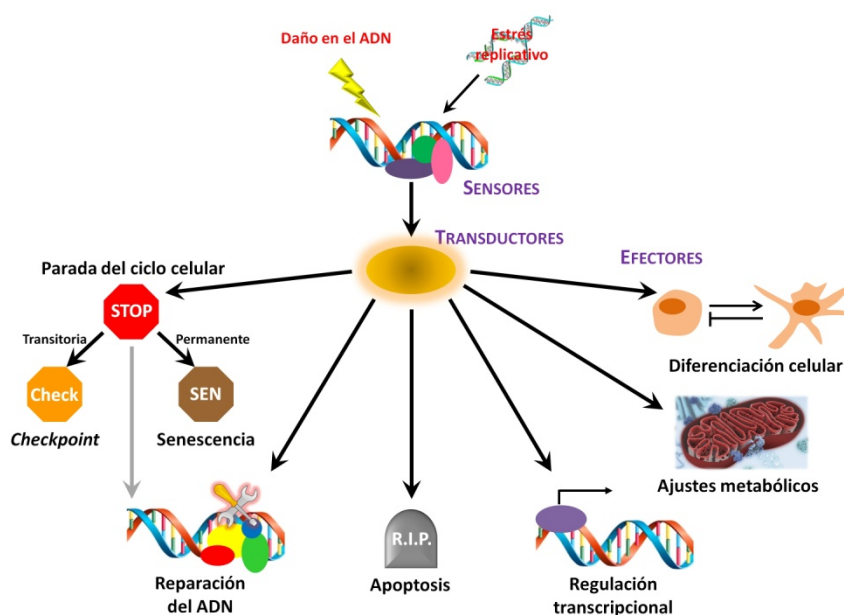
Paralelamente, otro nivel de señalización viene dado por el reclutamiento ante roturas del ADN de las E3-SUMO ligasas PIAS1 y PIAS4, las cuales, junto con la E2-SUMO conjugasa UBC9, catalizan la conjugación de SUMO2/3 y SUMO1, respectivamente (Lukas *et al.*, 2011). PIAS4 estimula la actividad ubiquitina ligasa del complejo RNF8-UBC13, promoviendo así el reclutamiento de RNF168, 53BP1 y BRCA1 a las DSBs. PIAS1 sumoíla directamente a BRCA1, estimulando su actividad ubiquitina ligasa (Galanty *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2009).

## 2.4. Otras rutas de señalización

En la DDR existen además otras cascadas de señalización fundamentales para expandir y modular la señal, basadas en otras modificaciones postraduccionales tales como metilación, acetilación, poli-ADP-ribosilación, otras ubiquitinaciones y otras sumoilaciones (van Attikum y Gasser, 2009; Polo y Jackson, 2011).

## 3. Efectos de la DDR

La cascada de señalización de la DDR, iniciada por las kinasas transductoras ATM y ATR, llega finalmente a las proteínas efectoras, que vienen dadas por una multitud de sustratos activados por ATM y ATR con el fin de coordinar la progresión del ciclo celular con la reparación del ADN. Se genera así una respuesta multifacética en la que intervienen también programas de transcripción y



ajustes metabólicos celulares. Como efectos finales tienen lugar la reparación del ADN, parada del ciclo celular, senescencia celular (replicativa), apoptosis y, en ciertos casos descritos, diferenciación celular (Figura 3) (Zhou y Elledge, 2000).

**Figura 3 | Efectos de la DDR.** Esquema de los efectos finales de la DDR en la célula. Cada respuesta depende del contexto celular, así como del tipo y la cantidad del daño. (Adaptado de Zhou y Elledge, 2000.)



### 3.1. Reparación del ADN

Para contrarrestar el daño en el ADN, la célula ha desarrollado distintos tipos de mecanismos de reparación específicos para muchos tipos de lesiones (Hakem, 2008; Ciccio y Elledge, 2010):

- **Reversión directa (*direct reversal*) del daño en el ADN:** Mecanismos de corrección de daños sencillos en bases del ADN llevados a cabo por una única enzima en un solo paso. Son capaces de eliminar muchas alquilaciones de bases gracias a la *O*<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) en mamíferos, así como de corregir pequeñas metilaciones de bases con ADN dioxigenasas (Sedgwick *et al.*, 2007).
- **Reparación de apareamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*):** Reemplaza las bases del ADN mal apareadas por las correctas. En mamíferos, el sistema está compuesto por dos heterodímeros: MutS, que puede ser MutSa (MSH2-MSH6) o MutSβ (MSH2-MSH3); y MutL, que puede ser MutLa (MLH1-PMS2), MutLβ (MLH1-PMS1) o MutLy (MLH1-MLH3). MutS reconoce la lesión y recluta a MutL, formándose una estructura que corta el fragmento de la cadena que contiene la lesión, para seguidamente ser rellenado por la acción de una ADN polimerasa y ligado por una ligasa. Responde también ante bucles de inserción/delección (IDLs, *insertion/deletion loops*), originados por las secuencias repetitivas de 1 ó 2 nucleótidos de los microsatélites, y entrecruzamientos intercatenarios (ICLs, *interstrand crosslinks*), además de disparar rutas de señalización conducentes incluso a apoptosis (Jiricny, 2006). El fallo en el sistema resulta comúnmente en inestabilidad de microsatélites (MSI, *microsatellite instability*), una de las fuerzas conductoras de ciertos cánceres humanos, como el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*, o síndrome de Lynch) (Hakem, 2008).
- **Reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*):** Repara las alteraciones químicas pequeñas de las bases del ADN a través de la eliminación de la base dañada. Ésta se lleva a cabo por ADN glicosilasas, generándose sitios abásicos (sitios AP, apurínicos o apirimidínicos) que son eliminados por la acción de nucleasas, seguidamente rellenados por una ADN polimerasa y finalmente ligados por una ligasa (Lindahl y Barnes, 2000). Se distinguen dos variantes: BER de parche corto (*short-patch BER*), que típicamente reemplaza un único nucleótido; y BER de parche largo (*long-patch BER*), que resulta en la incorporación de 2-13 nucleótidos (Hakem, 2008).
- **Reparación por escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*):** Corrige lesiones más complejas, tales como los dímeros de pirimidina y fotoproductos 6-4 (originados por la luz UV) y los entrecruzamientos intracatenarios (*intrastrand crosslinks*), mediante la eliminación de un oligonucleótido de aproximadamente 30 nt que contiene las bases

dañadas. La brecha monocatenaria que queda es rellenada por una ADN polimerasa que usa como molde la cadena no afectada (Hoeijmakers, 2009). Existen dos rutas posibles: NER global del genoma (GG-NER, *global genome NER*), que detecta y elimina lesiones por todo el genoma; y NER acoplado a transcripción (TC-NER, *transcription-coupled NER*), que repara genes activamente transcritos (Hakem, 2008). Defectos en este sistema causan importantes síndromes genéticos, como la xeroderma pigmentosa (*xeroderma pigmentosum*, XP) y el síndrome de Cockayne (Nospikel, 2009).

- **Reparación de ICLs (ICLR, *ICL repair*):** Se encarga de escindir los entrecruzamientos intercatenarios (ICLs, *interstrand crosslinks*), en un mecanismo en el que concursan las proteínas del síndrome genético de la anemia de Fanconi (ruta FA) (Moldovan y d'Andrea, 2009).
- **Síntesis translesión (TLS, *translesion synthesis*):** Si fallan otros mecanismos, como último recurso para la reparación se lleva a cabo la replicación del ADN dañado mediante las denominadas ADN polimerasas de TLS, que incorporan nucleótidos al azar en este proceso propenso a error (Sale, 2013).
- **Reparación de SSBs (SSBR, *SSB repair*):** Solventa las roturas de cadena sencilla (SSBs, *single-strand breaks*, “mellas” o “*nicks*”) del ADN, en rutas que implican como proteínas sensoras a PARP1 y otras PARP (poli-(ADP-ribosa) polimerasas), así como procesos de señalización por poli-ADP-ribosilación (Caldecott, 2008).
- **Reparación de DSBs (DSBR, *DSB repair*):** Las DSBs son procesadas y reparadas por, al menos, cinco mecanismos posibles: Unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) (NHEJ clásico, c-NHEJ, *classical NHEJ*); recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*); unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, *microhomology-mediated end-joining*) (NHEJ alternativo, alt-NHEJ, *alternative NHEJ*); anillamiento de cadena sencilla (SSA, *single-strand annealing*) (Ciccia y Elledge, 2010); y replicación inducida por rotura (BIR, *break-induced replication*) (Pardo *et al.*, 2009). Dada su gran importancia, se describen a continuación estos procesos (Figura 4), destacando especialmente el NHEJ y la HR.

### **Unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) (NHEJ clásico, c-NHEJ, *classical NHEJ*):**

El NHEJ es el mecanismo de reparación más común en células de mamífero. Se trata de un mecanismo rápido, aunque propenso a errores, que liga los extremos de la DSB de una forma rápida a expensas de generar posibles microdeleciones locales. A pesar de su baja fidelidad, esta vía puede actuar de forma urgente y, a diferencia de la HR, no depende de la existencia de una molécula de ADN



hermana, cosa que sólo ocurre tras la replicación, por lo que la vía puede ser utilizada en cualquier fase del ciclo celular. Además de las DSBs accidentales que ocurren aleatoriamente por todo el genoma, las que ocurren de forma programada en las recombinaciones V(D)J y de cambio de clase (CSR) también son reparadas por NHEJ (Nussenzweig *et al.*, 1996; Casellas *et al.*, 1998).

Los extremos rotos del ADN son detectados por el heterodímero Ku70-Ku80, que tiene una estructura toroidal con un agujero a través del cual se carga a los extremos de las DSBs (Mahaney *et al.*, 2009). Este sensor atrae a DNA-PKcs y ésta a su vez recluta a más proteínas al lugar de la lesión y las fosforila. Los extremos del ADN que contienen grupos no ligables son procesados por las nucleasas ARTEMIS y APLF y por la actividad kinasa/fosfatasa de la PNK (polinucleótido kinasa) (Mahaney *et al.*, 2009). La rotura es ligada por un complejo formado por ADN ligasa IV (LIG4) y XRCC4 (Hefferin y Tomkinson, 2005), con la ayuda del factor estimulador XLF (Mahaney *et al.*, 2009). A su vez, estas proteínas también son sustratos de ATM (Matsuoka *et al.*, 2007; Macrae *et al.*, 2008; Mahaney *et al.*, 2009).

### **Recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*):**

La HR restaura con precisión la secuencia genómica de los extremos de ADN rotos mediante la utilización de cromátidas hermanas como molde para la reparación. Involucra más factores e implica más pasos que el NHEJ para llevar a cabo la reparación. Entre los factores implicados en HR, algunos son de extrema importancia en la supresión tumoral en humanos, como BRCA1 y BRCA2, cuya ausencia compromete seriamente la HR (Yuan *et al.*, 1999; Welch *et al.*, 2000). La secuencia de acontecimientos de la HR transcurre como sigue:

- a) **Resección.** En primer lugar, para la búsqueda de homología en la cromátida hermana, es necesaria la generación de ssDNA, lo cual se lleva a cabo en el proceso de resección de los extremos del ADN. Los DSBs son reseccionados para generar largos segmentos de ssDNA (Hiom, 2000). El proceso requiere el reconocimiento inicial de la DSB por el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), que promueve la activación de ATM y la preparación del ADN para HR. Esto se lleva a cabo gracias a los dominos ATPasa de RAD50 (miembro de la familia SMC), que interactúan con MRE11 y se asocian con los extremos del ADN de la DSB, y a la estabilización y procesamiento de éstos por MRE11, que además tiene actividades endonucleasa y exonucleasa importantes para los pasos iniciales de la resección (Williams *et al.*, 2007). En la DSB, ATM activa a la endonucleasa CtIP (RBBP8), que interactúa física y funcionalmente con el complejo MRN (Sartori *et al.*, 2007) y con BRCA1 en el complejo BRCA1-C. Esta asociación con BRCA1 está regulada de manera dependiente del ciclo celular, de forma que sólo se produce en las fases S y G2, cuando el estatus de fosforilación de ésta es el adecuado (Ruffner y Verma, 1997). BRCA1, con actividad ubiquitina ligasa, ubiquitina a CtIP, facilitando su asociación con los sitios dañados (Huen *et al.*, 2010a). Seguidamente tiene lugar la etapa procesiva de la

resección, llevada a cabo por la actividad exonucleasa 5'→3' de EXO1, también estimulada por fosforilación por ATM, con la colaboración la helicasa BLM (responsable del síndrome de Bloom) (Bolderson *et al.*, 2010). Además, la nucleasa ARTEMIS, también regulada por ATM, desempeña cierto papel en la resección (Beucher *et al.*, 2009). En el proceso, ATM es también activada por el complejo MRN por mecanismos que implican la formación de oligos de ssDNA durante la resección (Lee y Paull, 2005; Jazayeri *et al.*, 2008; Kanaar y Wyman, 2008).

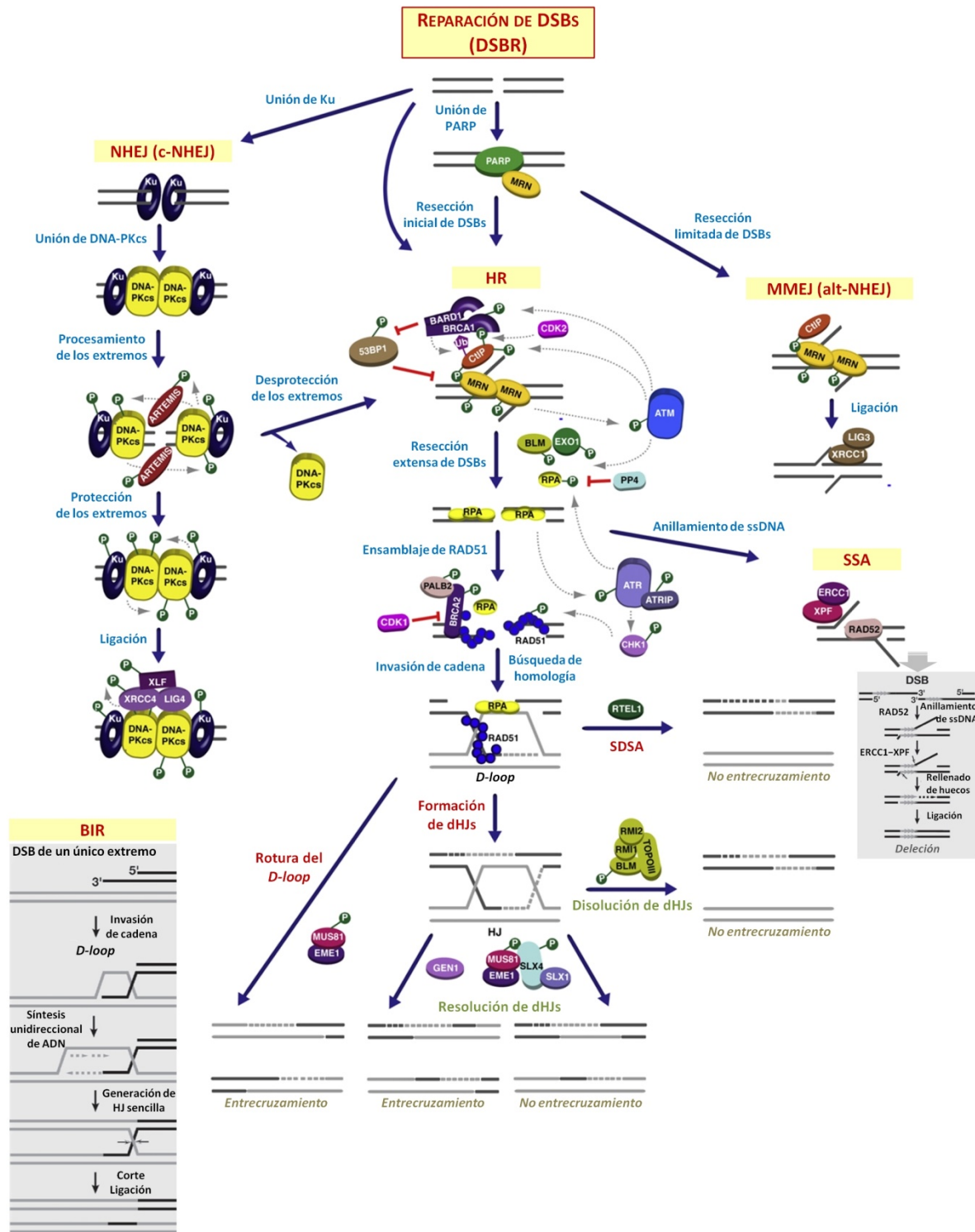
- b) **Invasión de cadena y búsqueda de homología.** Tras la resección, el ssDNA es recubierto por RPA, que actúa en forma de complejo heterotrimérico RPA1-RPA2-RPA3, dando paso a la búsqueda de homología en la cromátida hermana. Esto se consigue mediante el proceso de invasión de cadena, en el que el segmento de ssDNA debe invadir el ADN bicatenario de la cromátida hermana mediante desplazamiento de sus hebras complementarias unidas buscando en ellas secuencias homólogas complementarias. Para ello, RPA es sustituida por RAD51 (Benson *et al.*, 1994), proteína con capacidades invasivas formadora de filamentos sobre el ssDNA, fenómeno que está facilitado por RAD52 (New *et al.*, 1998) y catalizado por BRCA2, que forma un complejo con PALB2 (West, 2003). La interacción entre RAD51 y el extremo C-terminal de BRCA2 es determinante para que se dé la HR, y está limitada a las fases S y G2 del ciclo celular por fosforilación dependiente de CDKs de BRCA2 (Esashi *et al.*, 2005). La presencia de ssDNA y RPA también recluta a ATR, con lo que se dispara su señalización (Sartori *et al.*, 2007). Como resultado final de la invasión de cadena dependiente de RAD51, se obtiene en el ADN una estructura de bucle-D (*D-loop*) (West, 2003).
- c) **Procesamiento del *D-loop*.** Dependiendo de la ruta de HR por la que se lleve a cabo, se distinguen tres mecanismos posibles:
- **Anillamiento de cadena dependiente de síntesis (SDSA, *synthesis-dependent strand annealing*):** La cadena 3' invasora es extendida por ADN polimerasas y luego reanillada con el segundo extremo procesado de la rotura (West, 2003). Se producen el desplazamiento del filamento de RAD51 y la disociación del *D-loop*. La ruta es promovida por la helicasa RTEL1 (Barber *et al.*, 2008). La reparación transcurre sin entrecruzamiento entre las cromátidas hermanas (productos *non-crossover*).
  - **Formación de estructuras de Holliday dobles (dHJs, *double Holliday junctions*):** La migración de la rama (*branch migration*) del *D-loop* posibilita que la cadena invasora, extendida por ADN polimerasas, capture al segundo extremo de la rotura, produciéndose la ligación entre ellos. Se genera así una estructura de Holliday doble (dHJ, *double Holliday junction*) (West, 2003), que se repara por dos rutas posibles:

- **Disolución:** Se lleva a cabo por el complejo BTR, integrado por la helicasa BLM, la topoisomerasa III $\alpha$  (TOPOIII $\alpha$ ) y las proteínas RMI1 y RMI2. La helicasa BLM promueve la migración de rama de las dos HJs, dando lugar a una estructura hemicatenano que es desenredada por la topoisomerasa III $\alpha$ . El producto final de la reparación no presenta entrecruzamiento (*non-crossover*) entre las cromátidas hermanas de los marcadores que flanquean la dHJ (Wu y Hickson, 2003).
- **Resolución:** La dHJ se rompe por las denominadas endonucleasas de resolución o resolvasas, que reconocen específicamente estas estructuras. Se trata de GEN1, MUS81 (actuando junto con su cofactor EME1 en el complejo MUS81-EME1) y SLX1. Además, la proteína SLX4 funciona como plataforma de andamiaje a la que se unen SLX1 y el complejo MUS81-EME1 (Ciccina *et al.*, 2008; Ip *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2009; Fekairi *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009; Svendsen *et al.*, 2009). Los productos finales de la reparación pueden presentar (productos *crossover*) o no (productos *non-crossover*) entrecruzamiento entre las cromátidas hermanas de los marcadores que flanquean la dHJ, posibilidad que estaría finamente controlada por la fina regulación de estas endonucleasas, ya que el entrecruzamiento puede conducir a pérdida de heterocigosidad y reorganizaciones genómicas en células mitóticas (Ciccina y Elledge, 2010).
- **Rotura del D-loop (*D-loop cleavage*):** Se realiza directamente por acción de la endonucleasa de resolución MUS81-EME1, sin pasar por el estadio de dHJ. El producto final de la reparación presenta entrecruzamiento (*crossover*) entre las cromátidas hermanas de los marcadores que flanquean la dHJ (Ciccina y Elledge, 2010).

### **Unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, *microhomology-mediated end-joining*) (NHEJ alternativo, alt-NHEJ, *alternative NHEJ*):**

Esta ruta funciona como apoyo o “*backup*” para el NHEJ clásico y es independiente de Ku (Wang *et al.*, 2006). A diferencia de aquél, requiere resección de las DSBs, aunque menos extensa que en HR y SSA, de sólo 5-25 nt (Hartlerode y Scully, 2009), pero lo suficiente para implicar deleciones mucho mayores que las que ocurren en el NHEJ clásico. Por ello, se trata de una vía híbrida entre HR y NHEJ clásico, usada como último recurso en caso de que ambos fallen.

El sensor que detecta las DSBs es PARP1/2, promoviendo alt-NHEJ. Se cree que PARP1 media la acumulación inicial del complejo MRN en las DSBs, lo que seguidamente recluta a ATM (Haince *et al.*, 2007) y a CtIP junto con el resto de la maquinaria de resección a excepción de BRCA1. Tras la resección, independiente de BRCA1 a diferencia de en la HR, se produce el anillamiento de la pequeña región de homología entre ambas cadenas de ADN. Finalmente, se lleva a cabo la ligación de los extremos mediante un complejo formado por ADN ligasa III (LIG3) y XRCC1 (Yun y Hiom, 2009; You y Bailis, 2010).



**Figura 4 | Mecanismos de reparación de DSBs (DSBR).** En células de mamífero, los principales mecanismos para la reparación de DSBs son el NHEJ (unión de extremos no homólogos) (c-NHEJ, NHEJ clásico) y la HR (recombinación homóloga). En ciertas condiciones se usan otras tres rutas más: MMEJ (unión de extremos mediada por microhomología) (alt-NHEJ, NHEJ alternativo), SSA (anillamiento de cadena sencilla) y BIR (replicación inducida por rotura). La HR conduce a la formación de una estructura *D-loop* en el ADN, que a su vez puede procesarse por tres mecanismos diferentes: SDSA (anillamiento de cadena dependiente de síntesis), rotura del *D-loop*, y formación de dHJs (estructuras de Holliday dobles), las cuales pueden repararse por disolución o por resolución. En el esquema aparecen reflejados todos estos mecanismos, así como las interrelaciones entre ellos, según se han descrito en el texto. El proceso de BIR figura por separado, dada la naturaleza particular de la lesión que lo desencadena. (Adaptado de Ciccia y Elledge, 2010; Pardo *et al.*, 2009.)

### Anillamiento de cadena sencilla (SSA, *single-strand annealing*):

Este mecanismo de reparación suele darse cuando el daño se produce en secuencias repetitivas de ADN. Requiere resección de las DSBs, la cual se lleva a cabo por el mismo mecanismo que en la HR. A diferencia de en ésta, no se forma el filamento de RAD51 sobre el ssDNA recubierto por RPA, ya que no tiene lugar la interacción de BRCA2 con RAD51. En su lugar, se produce el anillamiento de las regiones de ssDNA complementarias resultantes tras la resección, proceso catalizado por RAD52. El ADN no homólogo de las “solapas” (“*flaps*”) no anilladas que quedan en los extremos es eliminado por la endonucleasa ERCC1, que actúa en el complejo ERCC1-XPF (Motycka *et al.*, 2004; Hartlerode y Scully, 2009). Seguidamente, una ADN polimerasa rellena los huecos de ssDNA, para producirse finalmente la ligación de los extremos. Se genera por tanto una delección en el producto de la reparación.

### Replicación inducida por rotura (BIR, *break-induced replication*):

Se trata de un mecanismo de recombinación homóloga especial para DSBs de un único extremo, que se da cuando solamente puede usarse éste para reparación. Éste es el caso cuando sólo uno de los extremos de la DSB comparte homología con otra región del genoma o cuando se ha perdido un extremo de la molécula de ADN rota. Por ejemplo, se generan DSBs de un único extremo en los telómeros que han perdido sus repeticiones teloméricas protectoras y en el colapso (rotura) de las horquillas de replicación (Pardo *et al.*, 2009).

El extremo de la DSB invade una secuencia homóloga en la cromátida hermana, formándose un *D-loop*. Se inicia entonces una síntesis de ADN unidireccional desde el sitio de invasión de cadena, replicándose el molde cromosómico. Se genera así una estructura de Holliday sencilla (*single HJ*) que finalmente se rompe y se ligan los extremos. Como resultado, la reparación de la DSB está asociada con la duplicación completa del brazo cromosómico usado como molde. En consecuencia, el BIR podría resultar en una pérdida de heterocigosidad a gran escala, si ocurre entre cromosomas homólogos (Voelkel-Meiman y Roeder, 1990; Morrow *et al.*, 1997; Pardo *et al.*, 2009).

## 3.2. Parada del ciclo celular

La DDR retrasa la progresión del ciclo celular para dar tiempo a la reparación del ADN, modulando transitoriamente los mecanismos que regulan la actividad de las CDKs (quinasas dependientes de ciclina, *cyclin-dependent kinases*), las kinasas que gobiernan el control del ciclo celular (Abraham, 2001). Este efecto se lleva a cabo mediante la activación de ciertos puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular gracias a las kinasas efectoras de *checkpoint*, CHK1 y CHK2 (Lukas *et al.*, 2003; Lukas *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2006). CHK2 es activada por fosforilación por ATM en T<sup>68</sup> (Matsuoka *et al.*, 1998) y CHK1 por fosforilación por ATR en S<sup>317</sup> y S<sup>345</sup> (Liu *et al.*, 2000; Zhao y Piwnicka-Worms, 2001).

### ▪ **Checkpoint G1/S:**

La DDR evita la entrada en fase S en la célula dañada actuando mediante dos efectores principales que funcionan en paralelo (Lukas *et al.*, 2004):

- **Parada rápida del ciclo a través de CDC25A:** En respuesta a daño en el ADN, CHK1 y CHK2 (principalmente, ya que en G1 la respuesta de ATR es muy reducida) activadas fosforilan a la fosfatasa activadora CDC25A (Jin *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003), lo que la marca para su ubiquitinación por SCF/ $\beta$ -TRCP y degradación por el proteasoma (Mailand *et al.*, 2000; Busino *et al.*, 2003). Se evita así que desfosfore a CDK2 eliminando la fosforilación inhibitoria en Y<sup>15</sup> (llevada a cabo de forma constitutiva por Wee1, kinasa inhibidora de CDKs (Parker y Piwnica-Worms, 1992; Booher *et al.*, 1997)) y la active, con lo que los complejos Ciclina E-CDK2 y Ciclina A-CDK2 se mantienen inactivos y el ciclo queda detenido en G1.
- **Mantenimiento de la parada del ciclo a través de p53:** Ante daño en el ADN, ATM (principalmente) y ATR fosforilan a p53 en S<sup>15</sup>, lo que la activa y estabiliza (Canman *et al.*, 1998; Tibbets *et al.*, 1999). CHK2 (principalmente), activada por ATM, así como CHK1, activada por ATR, también ejercen este efecto sobre p53, al fosforilarla en S<sup>20</sup> y T<sup>18</sup> (Hirao, 2000; Shieh *et al.*, 2000). Además, ATM interacciona con MDM2, el regulador negativo de p53, una E3-ubiquitina ligasa que, de forma constitutiva, la mantiene secuestrada y la ubiquitina para degradación proteasómica (Shieh *et al.*, 1997; Ashcroft *et al.*, 1999). Como consecuencia, la capacidad de p53 para activar sus genes diana aumenta considerablemente (Dumaz y Meek, 1999). Se induce así la expresión de p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, que se acumula horas después de detectarse el daño e inhibe la actividad del complejo Ciclina E-CDK2, impidiendo la transición de G1 a S (Sherr y Roberts, 1999), complementando la respuesta al mantener la parada por más tiempo. Aunque la fosforilación de CDC25A y p53 ocurre rápidamente y de forma simultánea, esta cascada es más lenta que la de CDC25A, ya que requiere síntesis de nuevas proteínas (Mailand *et al.*, 2000). Sin embargo, el control del *checkpoint* se lleva a cabo por la acumulación de p53, y la prueba de ello es que la ausencia de esta proteína conlleva la supresión total de esta parada (Lukas *et al.*, 2004).

### ▪ **Checkpoint Intra-S (de replicación):**

Este *checkpoint* es en realidad un retraso reversible y transitorio de la progresión del ciclo, más que una parada. Actúa mediante dos efectos distintos:

- **Inhibición del disparo de nuevos orígenes de replicación:** Se produce a través de la fosforilación de la CDC25A por CHK1 y CHK2 activadas, con su consiguiente degradación, lo que resulta en la inhibición del complejo Ciclina E-CDK2, necesario para la progresión en



fase S (Bartek y Lukas 2003; Bartek *et al.*, 2004). Se ha sugerido que otro efector de este *checkpoint* es la cohesina SMC1, fosforilada por ATM (Kitagawa *et al.*, 2004).

- **Mantenimiento de las horquillas de replicación:** Se previene el colapso de las horquillas de replicación, evitando que se produzcan DSBs (Osborn *et al.*, 2002; Bartek *et al.*, 2004). La estabilidad de la horquilla es promovida por el complejo TIM-Tipin (Timeless-Tipin) y Claspin, ambos dianas de ATR (Errico y Costanzo, 2010). Tipin y su compañera, Timeless (TIM), se asocian con RPA2 para estabilizar las horquillas atascadas y promover la acumulación de CHK1 y su proteína reguladora Claspin en regiones de ssDNA-RPA, donde CHK1 puede ser activada por ATR (Kemp *et al.*, 2010).

#### ▪ **Checkpoint G2/M:**

La parada en la transición G2/M evita que entren en mitosis células que han sufrido lesiones durante G2 o que han progresado a través de G2 con lesiones no reparadas desde G1 o S. La acumulación de células en G2 también puede ser un reflejo del *checkpoint* de replicación, que ha detectado lesiones durante la replicación del ADN señalizadas por ATR. Al igual que el *checkpoint* G1/M, actúa mediante dos ejes distintos:

- **Parada rápida del ciclo a través de CDC25A y CDC25C:** CHK1 (principalmente, debido a la activación de ATR) y CHK2 activadas fosforilan a la fosfatasa activadora CDC25A, y CHK1 activada a CDC25C (específica del complejo Ciclina B-CDK1) (Jin *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2003). Ambas fosfatasas activadoras son por tanto degradadas. Se evita así que activen a CDK1 por eliminación de sus fosforilaciones inhibitorias (llevadas a cabo constitutivamente por Wee1 en Y<sup>15</sup> y por Myt1 en T<sup>18</sup>, ambas kinasas inhibitorias de CDKs (Parker y Piwnicka-Worms, 1992; Booher *et al.*, 1997)), con lo que el complejo Ciclina B-CDK1 se mantiene inactivo y se evita la entrada en mitosis (Donzelli y Draetta, 2003).
- **Mantenimiento de la parada del ciclo a través de p53:** De nuevo, el eje p53/ p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, ahora activado mayoritariamente por ATR, se encarga del mantenimiento del *checkpoint*, aunque tiene un papel menos importante que en el *checkpoint* G1/S (Taylor y Stark, 2001; Nyberg *et al.*, 2002), ya que p21 es un inhibidor menos potente del complejo Ciclina B-CDK1 (Harper *et al.*, 1995). Otros productos transcripcionales de p53 ejercen también como efectores del *checkpoint* G2/M, tales como GADD45 (inhibidor del complejo Ciclina B-CDK1) y la proteína 14-3-3 (secuestra al complejo Ciclina B-CDK1, posibilitando su degradación por el proteasoma) (Taylor y Stark, 2001).

### 3.3. Senescencia celular (replicativa)

La senescencia celular o senescencia replicativa consiste en un fenómeno de parada permanente del ciclo celular, de forma que la célula, aunque sigue viva, deja de dividirse, quedando en estado irreversible de quiescencia (fase G0). Las células senescentes no responden a mitógenos ni a estímulos apoptóticos. Además, sufren cambios morfológicos característicos (generalmente, aumento de tamaño por incremento de los volúmenes nuclear y citosólico) y presentan características metabólicas distintivas. El estado de senescencia se mantiene por la secreción autocrina de ciertas interleukinas, destacando IL-6. La senescencia se da tanto *in vitro*, en células en cultivo, como *in vivo*, en células del organismo (Collado *et al.*, 2005).

Un marcador distintivo de las células senescentes es la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -Gal, *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*), usada comúnmente como biomarcador para la detección de células senescentes (Dimri *et al.*, 1995).

Un fenómeno específico de senescencia en células humanas es la formación nuclear de focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHFs, *senescence-associated heterochromatin foci*), visibles citológicamente por tinción inmunofluorescente con DAPI. Los SAHFs están enriquecidos en elementos específicos de la heterocromatina, como la proteína HP1 $\gamma$  (proteína de la heterocromatina 1 $\gamma$ , *heterochromatin protein 1 $\gamma$* ) y la marca epigenética H3K9me<sub>3</sub>, relacionada con compactación y represión. Su función es silenciar de forma permanente genes necesarios para la progresión del ciclo celular, tales como genes diana de E2F (Narita *et al.*, 2003).

El fenómeno de senescencia replicativa fue descrito por primera vez *in vitro* hace más de 50 años, al observarse que fibroblastos humanos en cultivo dejan de dividirse de forma irreversible tras 50-70 divisiones, número que se conoce como “límite de Hayflick”, designándose este proceso como “efecto Hayflick” (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Sin embargo, la existencia de células senescentes *in vivo* no se demostró hasta 1995, cuando se detectaron en dermis de humano mediante ensayo histoquímico de  $\beta$ -galactosidasa (Dimri *et al.*, 1995).

Una de las causas de la senescencia replicativa viene dada por el “reloj celular” que supone el acortamiento telomérico. En cada división, las células pierden 50-200 pb de las secuencias teloméricas debido a la imposibilidad de finalizar la replicación en los extremos de los cromosomas (Harley *et al.*, 1990). Al exceder cierto número de divisiones, los telómeros quedan tan acortados que no permiten la formación del bucle-T (*T-loop*), las estructuras de ADN protectoras de los extremos cromosómicos, por lo que quedan expuestos los extremos libres de ADN monocatenario. Estos telómeros disfuncionales son reconocidos como DSBs y son capaces de disparar una DDR (Martens *et al.*, 2000; d’Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003) que provoca la parada permanente del ciclo que constituye la senescencia replicativa.



Se ha sugerido que la senescencia puede ser un mecanismo celular de respuesta frente al estrés continuado. Así, en cultivo puede inducirse senescencia de forma prematura por estrés oxidativo (Parrinello *et al.*, 2003) o por tratamiento continuado con agentes genotóxicos, incluso en células tumorales (di Leonardo *et al.*, 1994; te Poele *et al.*, 2002).

La senescencia también se ha relacionado con la supresión tumoral (Smith y Pereira-Smith, 1996). Se demostró que la activación de oncogenes en fibroblastos en cultivo es capaz de hacer que las células entren en senescencia (Serrano *et al.*, 1997). Esto sucede también *in vivo* en lesiones tumorales humanas y murinas (Braig *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005). El proceso se conoce como senescencia inducida por oncogenes (OIS, *oncogene-induced senescence*), y en él los oncogenes (por ejemplo, *RAS*, *CDC6*, *STAT5* o *Ciclina E*) actúan como estímulo generando el denominado estrés oncogénico, que consiste en una hiperreplicación del ADN. Ésta dispara una DDR que por tanto actúa como barrera antitumoral activando las rutas de senescencia (Bartkova *et al.*, 2006; di Micco *et al.*, 2006; Mallette *et al.*, 2007).

Las rutas moleculares responsables de la senescencia celular dependen en mayor o menor medida de la desactivación total de la actividad CDK mediada por p53 y/o Rb, en cuyo control son relevantes los productos del locus *INK4A/ARF*, p16 y p19<sup>ARF</sup>, resultando este último esencial en la inducción de senescencia, en la medida en que regula la estabilidad y la respuesta de p53 (Pomerantz *et al.*, 1998).

Como rasgo distintivo de la senescencia asociada a daño en el ADN, las células senescentes dañadas detienen permanentemente su crecimiento, secretan citocinas inflamatorias y otras proteínas, y presentan focos nucleares persistentes que contienen proteínas de la DDR ( $\gamma$ H2AX, MDC1, 53BP1 y otras). Estos últimos se han denominado DNA-SCARS (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*, segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia) o, traduciendo el acrónimo, “cicatrices de ADN”. A diferencia de los focos normales y transitorios de proteínas de la DDR, las DNA-SCARS se asocian con los cuerpos nucleares PML, carecen de RPA, RAD51, ssDNA y síntesis de ADN, y acumulan formas activas de CHK2 y p53. Aunque se forman independientemente de p53, Rb y otras proteínas de *checkpoint* y reparación, requieren de las dos primeras para disparar la senescencia.  $\gamma$ H2AX actúa como componente estabilizador de las DNA-SCARS y su eliminación, aunque no elimina 53BP1, sí lo hace con MDC1 y CHK2 activado, además de reducir la senescencia y la secreción de citocinas (Rodier *et al.*, 2011).

### 3.4. Apoptosis

La decisión celular de optar por la muerte celular programada en lugar de otras respuestas menos severas viene determinada fundamentalmente por la intensidad de la señal, que es proporcional

al número y gravedad de las lesiones del ADN, y por la sensibilidad de cada tipo celular al daño. Sin embargo, se desconoce cómo está regulada esta dualidad aparente.

El efector principal de la apoptosis en respuesta a DSBs es p53. Al ser activada por la DDR, induce la transcripción de genes proapoptóticos tales como *BAX* (Miyashita y Reed, 1995), *NOXA* (Oda, 2000) y *PUMA* (Nakano y Vousden, 2001). Las proteínas están implicadas en desencadenar los procesos mitocondriales necesarios para la apoptosis, tales como la despolarización de la membrana mitocondrial y la salida del Citocromo c al citosol (Willis *et al.*, 2007). Este fenómeno provoca la formación de diversos complejos proteicos proapoptóticos latentes y culmina con la activación de las caspasas y la ejecución de la muerte celular mediante degradación controlada del ADN y otros componentes celulares.

### 3.5. Diferenciación celular

Se ha comprobado que en modelos murinos de inestabilidad genómica existe una disminución de la población de células madre causada por acumulación de daño en el ADN (Ruzankina *et al.*, 2007; Murga *et al.*, 2009). En principio se consideraba que esta reducción se debía a dos efectos principales de la DDR: La senescencia y la apoptosis en células madre (Sharpless y DePinho, 2007; Ruzankina *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio del impacto del daño en el ADN *in vivo* en células madre melanocíticas (proveedoras de melanocitos maduros necesarios para la pigmentación del pelo) reveló que la DDR induce la diferenciación de las células madre cuando el daño no puede ser reparado (Inomata *et al.*, 2009). Esta diferenciación disminuye el *pool* de células madre y conlleva la aparición de pelo gris en los animales. La DDR ayudaría así a mantener la calidad de la población de células madre al eliminar aquellas que están dañadas por inducción de la diferenciación en el nicho.

## 4. La DDR en el contexto de la cromatina

### 4.1. Organización del material genético en forma de cromatina

En células eucariotas, el material genético se halla compactado constituyendo la cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg, 1974), que consiste en aproximadamente 146 pb de ADN rodeando en unas 1.8 vueltas de superhélice levógira a un octámero de proteínas histonas. Éste contiene dos copias de cada una de las cuatro histonas principales (*core*) conservadas: H2A, H2B, H3 y H4. Cada proteína posee un dominio histona (*histone fold*), que media las interacciones histona-histona e histona-ADN que son cruciales para el ensamblaje de la partícula nucleosómica, y una cola amino-terminal flexible, que sobresale de la partícula central nucleosómica (Downs *et al.*, 2007). Entre cada nucleosoma existe un segmento de ADN libre denominado ADN espaciador (ADN *linker*), de longitud variable entre 0 y 80 pb, que garantiza flexibilidad a la estructura.

Este nivel de organización se conoce como fibra de cromatina de 11 nm (su diámetro) o estructura de “collar de perlas”.

La existencia de distintas variantes de histonas con variaciones en su secuencia de aminoácidos puede afectar tanto a la estructura de nucleosomas individuales como a la habilidad de éstos para formar estructuras de cromatina de orden superior. Además, la unión de proteínas tales como las histonas H1 (de unión o *linker*) y las proteínas del grupo de alta movilidad (HMG, *high-mobility group*) afectan a la arquitectura y grado de compactación de la cromatina (Downs *et al.*, 2007). Así, el segundo nivel de organización de la cromatina es la fibra de 30 nm o estructura de “solenoides”, compuesta por disposiciones regulares de empaquetamientos de nucleosomas unos sobre otros, constituidos gracias a la presencia de histonas H1 y otros factores arquitectónicos de la cromatina tales como las proteínas de los grupos HMG, HP1 y Polycomb. Los pasos siguientes en la organización de la cromatina son la fibra de 300 nm o estructura de “lazo de solenoides” y la fibra de 700 nm o estructura de “bucles radiales”, que se forman por el anclaje de la fibra a la periferia nuclear o a otros elementos como las láminas nucleares. La estructura más condensada de la cromatina viene dada por el cromosoma metafásico, de unos 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro con sus dos cromátidas, la cual permite la correcta segregación de las dos copias del genoma a cada célula hija en la división celular.

En los últimos años, se ha prestado especial atención al papel de la cromatina en la DDR, puesto que desempeña un papel importante en su iniciación, propagación y terminación. La maquinaria de reparación debe ser capaz de acceder a las lesiones en un ADN que en principio resulta inaccesible, por lo cual la dinámica de la cromatina en estos procesos resulta esencial (Downs *et al.*, 2007).

## 4.2. El “código de histonas” de la reparación del ADN

Un mecanismo importante para alterar la estructura de la cromatina implica la modificación covalente postraduccional de las colas protuberantes de las histonas (Downs *et al.*, 2007). Esto se lleva a cabo por una amplia variedad de enzimas modificadoras de histonas, incluyendo histona acetiltransferasas (HATs, *histone acetyltransferases*), histona metiltransferasas (HMTs, *histone methyltransferases*), proteína kinasas, ubiquitina ligasas, SUMO ligasas, poli-(ADP-ribosa) polimerasas, etc. Así, se ha identificado una amplia gama de modificaciones postraduccionales de histonas, incluyendo acetilación, metilación de lisina y arginina, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, desaminación (citrulinación), isomerización *cis/trans* de prolinas, succinilación, crotonilación, *N*-acetilglucosaminación, desaminación, hidroxilación, etc., así como sus opuestas, ya que generalmente son reversibles (Kouzarides, 2007). Se ha propuesto que la combinación de modificaciones (“marcas”) producida por la acción de estas enzimas constituye un “código” que regula procesos subsecuentes tales como transcripción, reparación del ADN y apoptosis (Turner, 2000; Jenuwein y Allis, 2001). Se trata del denominado “código de histonas”, que en el caso de la DDR puede denominarse como “código de histonas” de la reparación del ADN (Tabla 1), objeto de amplios

estudios en los últimos años, que imprime así un fuerte carácter epigenético a la DDR (van Attikum y Gasser, 2005; Downs *et al.*, 2007; Karagiannis y El-Osta, 2007).

Histona	Modificación	Enzima(s)
H1	H1p	DNA-PKcs
H2A	H2AK5ac H2AK13par H2AK13ub <sub>1</sub> H2K15ub <sub>1</sub> H2AKsu?	TIP60 PARP1, PARP2, PARP3 RNF168 RNF168 PIAS1, PIAS4
H2AX	H2AXK119ub H2AXS139p (γH2AX) H2AXY142p H2AXKsu?	RNF8, RNF168 DNA-PKcs, ATM, ATR WSTF PIAS1, PIAS4
H2B	H2BS14p H2BK30par H2BK120ub H2BKsu?	MST1 PARP1, PARP2, PARP3 RNF20/40 PIAS1, PIAS4
H3	H3K9ac H3S10p H3K27par H3S28p H3S31p H3K37par H3K56ac H3K79me H3Ksu?	GCN5 AURKB, MSK1, MSK2 PARP1, PARP2, PARP3 AURKB, MSK1, MSK2 AURKB, MSK1, MSK2 PARP1, PARP2, PARP3 GCN5, CBP, p300 DOTL1 PIAS1, PIAS4
H4	H4S1p H4K5ac H4K8ac H4K12ac H4K16ac H4K16par H4K20me <sub>1</sub> H4K20me <sub>2</sub> H4Ksu?	CK II HAT1/2, TIP60 HAT1/2, TIP60 HAT1/2, TIP60 HAT1/2, TIP60 PARP1, PARP2, PARP3 SET8 MMSET, Suv4-20h1,2 PIAS1, PIAS4

**Tabla 1 | “Código de histonas” de la reparación del ADN en mamíferos.** Se recogen las principales marcas de histonas implicadas en la DDR, así como las enzimas que catalizan dichas modificaciones postraduccionales. Simbología: ac = acetilación; me = metilación; p = fosforilación; par = poli-ADP-ribosilación; su = sumoilación (la “?” indica que aún está en estudio); ub = (poli)ubiquinación; los subíndices se refieren al número de grupos funcionales añadidos, cuando es posible añadir varios.

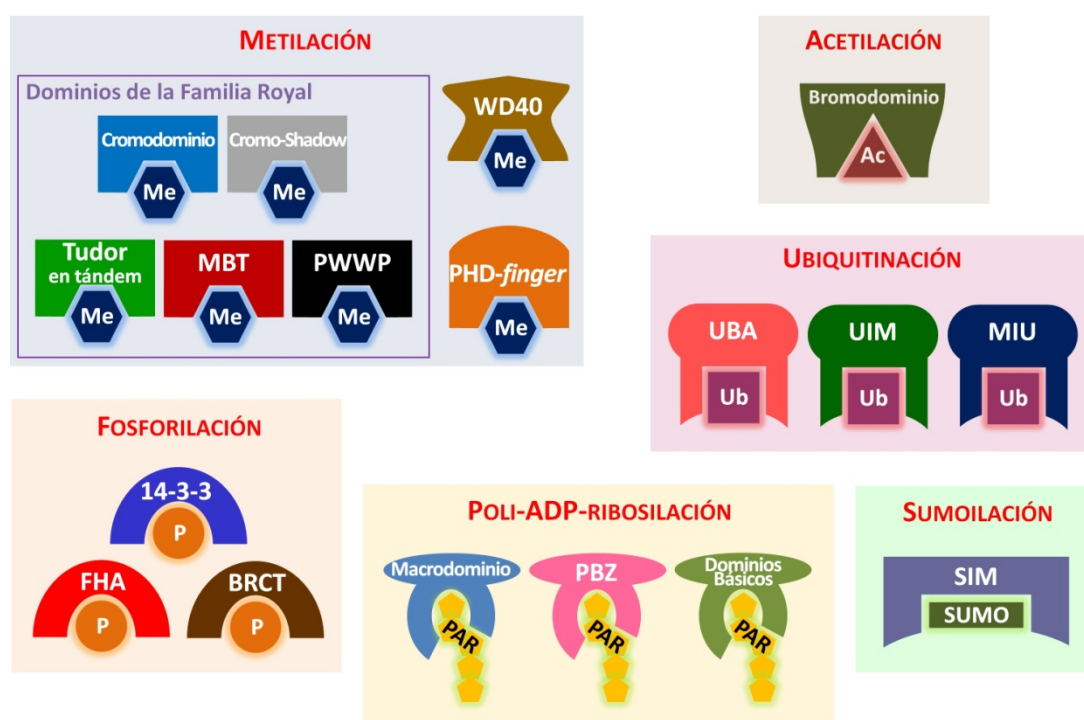
Las DSBs también activan ciertas modificaciones postraduccionales de histonas. La primera que se descubrió y la más robusta es la fosforilación de la histona H2AX (también conocida como H2AFX), variante de la histona H2A que de forma constitutiva aparece depositada con una frecuencia uniforme a lo largo de todo el genoma. H2AX es fosforilada en su extensa cola carboxi-terminal por las PIKKs (Rogakou *et al.*, 1998; Fernández-Capetillo *et al.*, 2004a). En cuestión de segundos tras producirse la DSB, H2AX es fosforilada en S<sup>139</sup> (H2AXS139p, modificación también conocida como  $\gamma$ H2AX) y se extiende por una región de kilo y megabases alrededor de la DSB (Rogakou *et al.*, 1999). Se ha sugerido que  $\gamma$ H2AX es responsable del reclutamiento de proteínas en la cromatina que flanquea la lesión, de forma que esta marca sería crucial para amplificar la señal cuando el daño se encuentra por debajo de un determinado umbral (Fernández-Capetillo *et al.*, 2002; Fernández-Capetillo *et al.*, 2003a; Fernández-Capetillo *et al.*, 2004a). Esta modificación está conservada en todos los eucariotas, indicativo de su gran importancia fisiológica. Aunque H2AX no está presente en los eucariotas inferiores, el motivo que se fosforila en respuesta a daño en el ADN sí lo está en las colas C-terminales de otros miembros de la familia H2A. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* está presente en la histona principal H2A, y en *Drosophila melanogaster* está en la variante H2AV (HIS2AV), miembro de la familia H2AZ (Downs *et al.*, 2007).

De especial importancia resulta la poli-ADP-ribosilación, ya que es la primera modificación detectable en los sitios de daño en el ADN inducido por clastógenos (Ciccia y Elledge, 2010; Polo y Jackson, 2011). Esta modificación se lleva a cabo por las poli-(ADP-ribosa) polimerasas PARP1, PARP2 y PARP3, que catalizan la adición de cadenas de poli-(ADP-ribosa) (PAR) a sus sustratos. La eliminación de PAR se lleva a cabo por la enzima PARG, una poli-(ADP-ribosa) glucohidrolasa (*poly-(ADP-ribose) glucohydrolase*) (Krishnakumar y Kraus, 2010). PARP1 poli-ADP-ribosila lisinas de las colas amino-terminales de las histonas principales, dando lugar a las marcas H2AK13par, H2BK30par, H3K27par, H3K37par y H4K16par (Messner *et al.*, 2010). También modifica remodeladores de cromatina, como el complejo NuRD y proteínas del grupo Polycomb. Estas enzimas pueden facilitar la reparación del ADN por silenciamiento transcripcional de la cromatina flanqueante a los sitios dañados, minimizando así la posibilidad de daño por colisión de las ARN polimerasas en elongación con la maquinaria de reparación (Lukas *et al.*, 2011). Por otra parte, la unión de cadenas de PAR puede actuar como punto de reclutamiento para éstos y otros complejos a las roturas del ADN (Chou *et al.*, 2010; Facchino *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010), e incluso propiciar, bajo ciertas condiciones, la relajación de la cromatina (Krishnakumar y Kraus, 2010).

Otras modificaciones de histonas presentes en las DSBs incluyen acetilaciones (H2AK5ac, H3K9ac, H3K56ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac), metilaciones (H3K79me, H4K20me<sub>2</sub>, en las que nos centraremos más adelante), ubiquitinaciones (H2BK120ub; H2AXK119ub, depositada por RNF8; H2AK13ub<sub>1</sub> y H2AK15ub<sub>1</sub>, ambas catalizadas por RNF168), fosforilaciones (H2BS14p, asociada con apoptosis en respuesta a daño en el ADN (Fernández-Capetillo *et al.*, 2004b); H1p, por DNA-

PKCs; H3S10/28/31p, por Aurora B, en entrada mitótica; H2AXY142p; H4S1p) y otras (Corpet y Almouzni, 2009; Downs *et al.*, 2007; van Attikum y Gasser, 2005). Algunos ejemplos se hallan recogidos en la Tabla 1.

Con respecto a la finalidad de estas marcas de histonas en la DDR, por una parte se postula que su misión podría ser la de promover una descompactación de la cromatina en la zona dañada, facilitando así el acceso a los factores de señalización y reparación (Kruhlak *et al.*, 2006a; Murga *et al.*, 2007). La modificación covalente de las histonas puede influir por sí misma en el estado de compactación de la cromatina, como ocurre con la apertura de la cromatina asociada a la acetilación debido a repulsión de cargas negativas y la compactación asociada a la desacetilación por el motivo contrario (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo principal por el cual estas modificaciones influyen en la estructura de la cromatina se lleva a cabo por el control de la unión de proteínas efectoras no histónicas a la cromatina, algunas de las cuales, como los remodeladores de cromatina, tienen la capacidad de alterar los contactos histona-ADN.



**Figura 5 | Dominios de unión a modificaciones de histonas.** Ejemplos de dominios proteicos de unión a cromatina, junto con el tipo de modificación postraducciona de histonas que reconocen. Gracias a ellos, las proteínas que los poseen constituyen los “lectores” del “código de histonas”.

Tales proteínas efectoras presentan dominios de unión a modificaciones específicas de histonas o, genéricamente, dominios de unión a cromatina (Figura 5) (van Attikum y Gasser, 2005; Downs *et al.*, 2007; Lukas y Bartek, 2008). Por ejemplo, los residuos de lisina acetilados son reconocidos por bromodominios; las metilaciones en distintos residuos son reconocidas por los dominios de la familia Royal (Maurer-Stroh *et al.*, 2003) (cromodominios, Chromo Shadow, Tudor (Du *et al.*, 2006), MBT

(tumor cerebral maligno, *malignant brain tumor*) (Trojer *et al.*, 2007), PWWP (Wang *et al.*, 2009)), dominios WD40 y dominios dedo-PHD (PHD-*finger*); las fosforilaciones, por dominios BRCT, FHA y 14-3-3; las ubiquitinaciones, por dominios UBA, UIM y MIU; las sumoilaciones, por dominios SIM; las ADP-ribosilaciones, por macrodominios, dominios básicos y PBZ, etc. (Downs *et al.*, 2007).

### 4.3. Remodelación de cromatina en la DDR

La estructura de la cromatina también se puede alterar por enzimas que la remodelan, los remodeladores de cromatina. El término remodelación de cromatina incluye una amplia variedad de cambios en la estructura de la cromatina, pero puede definirse como un cambio perceptible en los contactos histonas-ADN. Tales cambios en los contactos pueden resultar del reposicionamiento (deslizamiento, *sliding*) de nucleosomas sobre el ADN, la eliminación de parte o todo el octámero de histonas del ADN, un cambio inducido en la accesibilidad del ADN en la cromatina a proteínas (factores de transcripción, nucleasas, factores de la DDR), y el intercambio de variantes de histonas por histonas principales (Downs *et al.*, 2007).

La remodelación de cromatina dependiente de energía se lleva a cabo por grandes complejos proteicos multisubunidad. Sus subunidades catalíticas son ATPasas del grupo de helicasas de la superfamilia 2 (SF2), y se clasifican en 24 subfamilias (Flaus *et al.*, 2006). Los ejemplos más característicos de complejos remodeladores de cromatina con funciones en la DDR incluyen (Downs *et al.*, 2007):

- **RSC:** Puede mediar deslizamiento de nucleosomas, alterar los contactos histonas-ADN y eliminar histonas del ADN (Flaus *et al.*, 2006). Su actividad remodeladora está implicada en recombinación homóloga (Chai *et al.*, 2005). Su subunidad Sth1 se asocia con las DSBs *in vivo* (Shim *et al.*, 2005), lo cual se relaciona con la rápida movilización de los nucleosomas cercanos a una DSB hacia nuevas posiciones (Shim *et al.*, 2007). En *S. cerevisiae*, su ausencia retrasa la fosforilación de H2A (otra respuesta temprana) (Shim *et al.*, 2007).
- **SWI/SNF:** También cataliza deslizamiento de nucleosomas, alteración de los contactos histonas-ADN y eliminación de histonas del ADN (Flaus *et al.*, 2006). Se localiza igualmente en las DSBs, aunque a tiempos mucho más tardíos que el complejo RSC (Chai *et al.*, 2005). En *S. cerevisiae*, participa en la remodelación que ocurre en la sinapsis entre el ADN roto y su molde homólogo (Chai *et al.*, 2005). En mamíferos, la formación de  $\gamma$ H2AX es defectuosa en líneas celulares carentes de actividad SWI/SNF (Park *et al.*, 2006).
- **INO80:** *In vitro*, cataliza la reposición de nucleosomas (Flaus *et al.*, 2006) y presenta actividad helicasa (Shen *et al.*, 2000). También se asocia con las DSBs (Downs *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2004; van Attikum *et al.*, 2004), pero aparece en ellas mucho más tarde que la



fosforilación de H2A y su patrón de localización en éstas es diferente (Downs *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2004; van Attikum *et al.*, 2004). Esto sugiere que que el complejo INO80 no se requiere para la detección o señalización inicial de la DSB, sino para la reparación posterior (van Attikum *et al.*, 2004; Downs *et al.*, 2007). Parece funcionar en la adaptación a los *checkpoints*, mecanismo que confiere a la célula la capacidad de re-entrar en el ciclo celular y dividirse a pesar de la presencia de daño persistente en el ADN, lo cual haría afectando a la extensión de la fosforilación de H2A (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2006).

- **SWR:** Tiene la propiedad de eliminar dímeros H2A-H2B del nucleosoma y reemplazarlos por dímeros que contienen H2B y la variante Htz1, de tipo H2AZ, en *S. cerevisiae* (Mizuguchi *et al.*, 2004). En eucariotas superiores, se encuentran homólogos de su subunidad catalítica Swr1 en el complejo TIP60, que también contiene homólogos del complejo Nu4A de *S. cerevisiae*, el cual tiene actividad histona acetiltransferasa (HAT) y un papel clave en la DDR. Las actividades SWR y Nu4A estarían por tanto acopladas en la DDR. En *Drosophila*, la acetilación temprana de histonas en una DSB podría facilitar el posterior intercambio de la histona H2A fosforilada por H2AZ (Kusch *et al.*, 2004).
- **CHD:** Se trata de una familia de complejos remodeladores de nucleosomas con actividad helicasa caracterizados por poseer cromodominios, por lo que actúan en zonas donde existen ciertas metilaciones de histonas en residuos de lisina. Su disociación de las zonas dañadas causa relajación local de la cromatina (Goodarzi *et al.*, 2011).

#### 4.4. Impacto de la compactación de la cromatina en la DDR

En términos generales, cuanto más “abierta” esté la estructura de la cromatina, más eficiente será la DDR (Lukas *et al.*, 2011), lo que podría explicarse por una mayor accesibilidad de los factores de reparación a la zona de la lesión. De acuerdo con esto, la reducción genética de la histona H1, causante de una mayor compactación de la cromatina, conduce a una hiperresistencia al daño en el ADN y a sobreactivación de la señalización de los *checkpoints* (Murga *et al.*, 2007). Similares resultados se obtienen con inhibidores químicos de histona desacetilasas, que “relajan” globalmente la cromatina (Murga *et al.*, 2007).

Por el contrario, los dominios de cromatina hipercondensada se asocian con menor eficiencia en la reparación del ADN (Lukas *et al.*, 2011), posiblemente debido a impedimento estérico para que la lesión sea alcanzada por las proteínas de reparación. De hecho, la reparación de estos *loci* requiere la acción de la proteína KAP-1 (proteína asociada a KRAB 1, *KRAB-associated protein 1*), un modificador de la cromatina originariamente identificado por su papel en transcripción. KAP-1 tiene un papel importante en la reparación dependiente de ATM de lesiones heterocromáticas (Goodarzi *et al.*, 2010). La fosforilación de KAP-1 por ATM previene su interacción dependiente de SUMO con CHD3, un



remodelador de nucleosomas cuya disociación de los *loci* dañados causa relajación local de la cromatina (Goodarzi *et al.*, 2011).

El empaquetamiento de la cromatina en estructuras de orden superior supone una barrera para la detección y reparación del daño en el ADN. Sin embargo, un estudio llevado a cabo hace casi tres décadas indicaba que las DSBs causan reorganización de la cromatina, como se mostró por el acceso alterado de nucleasas al ADN dañado (Takahashi y Kaneko, 1985). Posteriormente, se demostró que las DSBs inducen una disminución local en la densidad de la fibra de cromatina, además de alterar la posición de los nucleosomas y causar el desalojo del octámero de histonas (Tsukuda *et al.*, 2005; Kruhlak *et al.*, 2006a; Shim *et al.*, 2007). Se cree que, en ciertos casos, estos eventos remodeladores podrían hacer la lesión más accesible a las proteínas sensoras del daño mediante la exposición de características del nucleosoma, tales como modificaciones de histonas constitutivas, que estarían normalmente ocultas en la célula no perturbada (Huyen *et al.*, 2004). Las actividades remodeladoras de cromatina parecen facilitar el acceso de proteínas de reparación y de señalización de los *checkpoints* a la lesión en el ADN. Además, la relajación de la cromatina cercana, más que la DSB por sí misma, podría ser el disparador que inicialmente active a ATM (Bakkenist y Kastan, 2003). La descondensación de la cromatina que se observa que ocurre en segundos tras la inducción de DSBs queda confinada al sitio de la rotura (Kruhlak *et al.*, 2006a; Kruhlak *et al.*, 2006b). A este respecto, un trabajo reciente propone que no sólo el daño en el ADN, sino también alteraciones de la cromatina por sí mismas inducen la fosforilación en tirosina de la proteína acetiltransferasa KAT5 (TIP60) por ABL (producto del proto-oncogén *c-Abl*). Esto promueve la unión de KAT5 a la marca de compactación H3K9me<sub>3</sub>, disparándose la acetilación de ATM por ésta, lo que favorece su activación (Kaidi y Jackson, 2013).

También se ha sugerido que las alteraciones de la cromatina ante DSBs se extienden globalmente, gracias a una ruta dependiente de ATM. Ante DSBs, ATM fosforila a KAP-1 en la lesión, y KAP-1 se propaga rápidamente a lo largo de la cromatina, provocando un desmantelamiento de la cromatina a gran escala que facilitaría la reparación de DSBs (Ziv *et al.*, 2006). Del mismo modo, en la ruta de NER, la exposición a radiación UV aumenta la accesibilidad de la cromatina en un proceso que estaría mediado por p53 (Rubbi y Milner, 2003). Por otra parte, se descubrió que, instantes después de la generación de DSBs, la proteína HP1 $\beta$ , que normalmente se encuentra unida a la heterocromatina por reconocimiento de H3K9me<sub>3</sub>, se moviliza de ésta en un proceso que parece ser necesario para la fosforilación de H2AX (Ayoub *et al.*, 2008).

La acumulación de proteínas de reparación se observa normalmente en la periferia de los dominios de heterocromatina, conduciendo ello a la especulación de que los dominios nucleares compactos son refractarios a la rotura del ADN inducida por clastógenos. Aunque a veces éste podría ser el caso, en *Drosophila* las DSBs pueden ocurrir en la heterocromatina, pero entonces son extruidas a la periferia para sufrir reparación por recombinación homóloga (Chiolo *et al.*, 2011). Esta

relocalización es un proceso activo que implica resección de las DSBs y la acción del complejo SMC5-SMC6 (relacionado con cohesinas y condensinas), existiendo una gran similitud entre este mecanismo y el descrito para la reparación del ADN ribosómico (ADNr) en levaduras (Torres-Rosell *et al.*, 2007). Puesto que en eucariotas la heterocromatina está frecuentemente enriquecida en elementos repetitivos, la extrusión transitoria de DSBs fuera de dominios cromosómicos altamente recombinogénicos podría ser una fascinante adaptación evolutiva para reducir las reorganizaciones genómicas (Lukas *et al.*, 2011).

#### 4.5. Formación de focos por las proteínas de la DDR

En presencia de daño en el ADN, muchas de las proteínas de la DDR sufren un cambio en su localización nuclear, pasando de una localización nucleoplásmica o dispersa por la cromatina a reclutarse en torno a las DSBs (Fernández-Capetillo *et al.*, 2003b). Proteínas implicadas en reparación del ADN, *checkpoints* del ciclo celular y remodelación de cromatina forman agregados que son citológicamente detectables por inmunofluorescencia como focos nucleares (Bekker-Jensen *et al.*, 2006). Generalmente, este ensamblaje dinámico de proteínas en focos requiere primero la fosforilación de la histona H2AX por las PIKKs en una extensa región rodeando la lesión. Cuando estos focos se deben a la generación de DSBs y, por tanto, son inducibles por radiación ionizante, son comúnmente designados como IRIF (focos inducidos por radiación ionizante, *ionizing radiation-induced foci*).

Aunque parezca trivial, en realidad uno de los aspectos más enigmáticos de la respuesta de la cromatina al daño en el ADN es el considerable tamaño de los segmentos de ADN modificados ante una rotura. Estudios de modelización cinética sugieren que no es probable que todas las moléculas de un factor dado inmovilizadas cerca de la lesión estén directamente implicadas en reparación (Dinant *et al.*, 2009). Igualmente, muchas de las proteínas que interaccionan con histonas modificadas ante daño en el ADN no participan directamente en reparación. Así pues, los focos de proteínas y modificaciones de histonas característicos de la DDR tendrían otras funciones adicionales además de la reparación y señalización del daño (Lukas *et al.*, 2011), como son:

- ✓ **Represión transcripcional en los dominios de cromatina flanqueantes al daño en el ADN:** Llevada a cabo por la ubiquitinación de la histona H2A por la ruta RNF8-RNF168 (Ciccia y Elledge, 2010; Bekker-Jensen y Mailand, 2011; Polo y Jackson, 2011), que contribuye a silenciamiento transcripcional local por inhibición de la elongación por la ARN polimerasa II (Shanbhag *et al.*, 2010). Se evitarían así intrusiones accidentales de ésta en los sitios de reparación activa.
- ✓ **Protección de regiones genómicas expuestas a estrés replicativo:** Llevado a cabo por los cuerpos nucleares (NBs, *nuclear bodies*) de la proteína 53BP1 (Lukas *et al.*, 2011), como veremos en el apartado correspondiente.

- ✓ **Establecimiento de una barrera de cromatina contra resección excesiva o no programada:**  
También gracias a 53BP1 junto con RIF1 (Chapman *et al.*, 2013; di Virgilio *et al.*, 2013; Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2013), como se verá más adelante.

## 5. 53BP1: Una proteína mediadora en la DDR

### 5.1. Características generales

Una de tales proteínas formadoras de focos de la DDR que actúa a nivel de la cromatina es 53BP1 (proteína de unión a p53 1, *p53-binding protein 1*, o bien TP53BP1). Fue identificada en el año 1994 en experimentos de doble híbrido de levadura destinados a encontrar proteínas de interacción con p53 (Iwabuchi *et al.*, 1994). Se hallaron así dos proteínas no homólogas, designadas como 53BP1 y 53BP2. Esta última no está relacionada con la DDR, si bien es un regulador apoptótico por la vía mitocondrial, especialmente su variante por *splicing* alternativo ASPP2 (Takahashi *et al.*, 2004).

En cuanto a 53BP1, se sabe que su unión a p53 se produce únicamente *in vitro* (Roy *et al.*, 2010) y es bien conocida como proteína formadora de focos ante DSBs (Schultz *et al.*, 2000). Por inmunofluorescencia o mediante etiquetado con proteínas fluorescentes se observa cómo tras irradiar la célula con radiación  $\gamma$ , a los pocos minutos 53BP1 pasa de una localización pan-nuclear a formar agrupaciones discretas en forma de focos, también conocidos como IRIF (focos inducidos por radiación ionizante, *ionizing radiation-induced foci*). Éstos colocalizan con  $\gamma$ H2AX, usado como marcador de DSBs en el ADN. Por otra parte, son independientes de proteínas como NBS1, ATM y p53 (Xie *et al.*, 2007).

Se asume que 53BP1 tiene un papel como proteína mediadora/adaptadora en la DDR a DSBs, de actuación muy temprana (Schultz *et al.*, 2000; FitzGerald *et al.*, 2009). Esto se ha estudiado ampliamente en sus ortólogos de levaduras (Rad9 en *Saccharomyces cerevisiae* y Crb2 en *Schizosaccharomyces pombe*). No presenta actividad enzimática caracterizada, por lo que se cree que puede actuar como plataforma de reclutamiento para otras proteínas de la DDR (Li y Zou, 2005; Lukas C. *et al.*, 2004), al igual que MDC1 y BRCA1, también ortólogos de Rad9/Crb2 de levaduras (Koonin *et al.*, 1996; Bork *et al.*, 1997).

### 5.2. Ruta de señalización para el reclutamiento y regulación de 53BP1

El reclutamiento de 53BP1 a las DSBs depende en primer lugar de la ruta de ubiquitinación por RNF8 y RNF168. La retención de 53BP1 en la cromatina flanqueante a las DSBs requiere además la sumoilación por el complejo PIAS4-UBC9 (Ciccio y Elledge, 2010; Jackson y Bartek, 2009; Lukas *et al.*,

2011). La E3-SUMO ligasa PIAS4, además estimular la actividad de RNF8, se cree que también sumoila directamente a 53BP1 (Galanty *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha de realización de esta tesis, no se habían descrito en 53BP1 actividades de unión a ubiquitina o a SUMO (FitzGerald *et al.*, 2009). Por tanto, el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs y la formación de focos se producen por mecanismos aún no muy bien elucidados, pero que coinciden en la dependencia de la marca de histonas H4K20me<sub>2</sub> (dimetilación de la histona H4 en Lys<sup>20</sup>) (Huyen *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2004; Botuyan *et al.*, 2006). Cuando 53BP1 es reclutada a las DSBs, es fosforilada por ATM en S<sup>25</sup> y S<sup>1778</sup> (Jowsey *et al.*, 2007), lo que marca su activación (Lee *et al.*, 2009).

Entre los factores que promueven el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs se encuentra PTIP, proteína con seis dominios BRCT, cuyo reclutamiento es dependiente de fosforilaciones y de RNF8 (Wu *et al.*, 2009). La nucleoporina NUP153 promueve la importación nuclear específica de 53BP1, que se lleva a cabo por la ruta NUP153–Importina-β (Moudry *et al.*, 2012a). La desacetilación por HDACs (histona desacetilasas, *histone deacetylases*) de H4K16 en las DSBs también facilita la formación de focos de 53BP1 (Hsiao y Mizzen, 2013).

Existen también proteínas que inhiben el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs. Las más evidentes son las enzimas desubiquitinizantes (DUBs, *deubiquitylating enzymes*) que se contraponen a la cascada de ubiquitinaciones de RNF8-RNF168, tales como OTUB1, BRCC36, POH1, USP3, USP16, USP28, USP44 y USP29 (Mosbech *et al.*, 2013). De hecho, se ha descrito que 53BP1 se asocia con USP28 (Zhang *et al.*, 2006), quizá controlando así el apagado de la ruta. La E3-ubiquitina ligasa RNF169 se une también a las ubiquitinaciones de RNF168, impidiendo así la unión de 53BP1 para que la reparación tenga lugar por HR en vez de por NHEJ (Poulsen *et al.*, 2012). La proteína fosfatasa PP5 desfosforila a 53BP1 en S<sup>25</sup> y S<sup>1778</sup> en los focos, lo cual afecta al NHEJ promovido por 53BP1 (Kang *et al.*, 2009). La acetilación H4K16ac por la histona acetiltransferasa TIP60 disminuye la unión de 53BP1 a H4K20me<sub>2</sub>, lo que conlleva inhibición de NHEJ y favorecimiento de HR (Tang *et al.*, 2013). Por último, un trabajo propone que en células de cáncer de mama la pérdida de BRCA1 activa la degradación de 53BP1 mediada por Catepsina L (Grotsky *et al.*, 2013).

### 5.3. Funciones biológicas de 53BP1

53BP1 se comporta como un supresor tumoral haploinsuficiente (Ward *et al.*, 2005; Squatrito *et al.*, 2012). Esto se debe a las funciones que primero se le descubrieron tanto en señalización como en reparación de DSBs, aunque posteriores estudios han revelado funciones más concretas y específicas. Todas ellas se recogen a continuación (Figura 6):

### ✓ Señalización de DSBs:

Actúa en activación de los *checkpoints* de daño en el ADN en la medida en que, de forma similar a Rad9 de levadura (Pellicioli y Foiani, 2005), es necesaria para la fosforilación eficiente de CHK2 en T<sup>68</sup> (Fernández-Capetillo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2003), facilita los eventos de fosforilación dependientes de ATM (Mochan *et al.*, 2003; Wilson y Stern, 2008) y, en algunas líneas celulares, se requiere además para la autofosforilación de ATM en S<sup>1981</sup> con su consecuente activación.

Por otra parte, también se ha descrito un posible papel para 53BP1 en el *checkpoint* intra-S mediado por CHK1, a través de la interacción y colocalización en focos entre 53BP1, BLM y RAD51, que es dependiente de fosforilación por CHK1 e independiente de  $\gamma$ H2AX. Esta interacción es importante para el papel de estas proteínas en regulación de la recombinación homóloga, especialmente en condiciones de estrés replicativo (Sengupta *et al.*, 2004; Tripathi *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2008). Actualmente, la función de estas interacciones se puede interpretar en base al efecto de 53BP1 como inhibidor de resección, la cual promueven helicasas como BLM.

### ✓ Reparación de DSBs (función pro-NHEJ):

La importancia de 53BP1 queda patente en el ratón *knock-out* (KO) para el gen *53BP1*, que presenta un fenotipo relacionado con inestabilidad genómica (inmunodeficiencias, crecimiento retardado, anormalidades cromosómicas, reparación del ADN alterada, sensible a radiación, propenso a tumores) (Ward *et al.*, 2003). Se ha demostrado que 53BP1 es un factor de NHEJ, siendo necesario, en concreto, para el NHEJ de largo alcance (*long-range NHEJ*). Facilita la unión a larga distancia de extremos de ADN no homólogos mediante un mecanismo facilitador de la movilidad de la cromatina en el que podrían estar implicadas proteínas motoras de tipo dineína (Lo *et al.*, 2005). Esto se pone de manifiesto en el incremento de la fusión de télómeros desprotegidos (Dimitrova *et al.*, 2008), así como de la tasa de recombinación de cambio de clase (CSR) (Manis *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2004) y de recombinación V(D)J de larga distancia (Difilippantonio *et al.*, 2008) en los *loci* de las inmunoglobulinas.

### ✓ Limitación de resección (función anti-HR):

Recientemente se ha elucidado que la fosforilación por ATM de la región N-terminal de 53BP1 en las DSBs permite el reclutamiento de RIF1 a éstas. RIF1 interacciona con CtIP inhibiéndola, lo que inhibe la resección 5' de los extremos del ADN en las DSBs, impidiendo la recombinación homóloga y promoviendo NHEJ (di Virgilio *et al.*, 2013; Zimmermann *et*

*al.*, 2013). Esto ocurre en fase G1, mientras que en S y G2 BRCA1 antagoniza este efecto al unirse a CtIP (Chapman *et al.*, 2013; Escribano-Díaz *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013).

Este mecanismo es la base de la interacción de *fitness* sintético (viabilidad sintética) entre *BRCA1* y *53BP1* (la pérdida de ambos genes rescata el defecto de la pérdida independiente de cada uno de ellos) (Aly y Ganesan, 2011) previamente mostrada en varios trabajos. En células carentes de BRCA1, los inhibidores de PARP1 (PARPi, *PARP inhibitors*) inducen la formación de cromosomas radiales letales, que se cree que resultan de DSBs mal unidas (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005). Esta interacción de letalidad sintética condicional se ha usado para el tratamiento de muchos tumores (Aly y Ganesan, 2011). La delección de *53BP1* previene la formación de estos cromosomas aberrantes y rescata la letalidad de la deficiencia de BRCA1 en ratón (Cao *et al.*, 2009; Bunting *et al.*, 2010; Bouwman *et al.*, 2010; Kass *et al.*, 2010; Bunting *et al.*, 2012). La explicación viene de que en las células deficientes en BRCA1, en presencia de PARPi, *53BP1* forzaría que toda la reparación se llevara a cabo por NHEJ, que en última instancia resultaría defectuoso y tóxico, lo que conllevaría los efectos letales descritos.

Un estudio más reciente demuestra que estos efectos tóxicos dependen del reclutamiento de PTIP por la S<sup>25</sup> de *53BP1* fosforilada por ATM, lo que actúa inhibiendo resección (Callén *et al.*, 2013). Este mecanismo es independiente de la interacción con RIF1, que se lleva a cabo a través de otros residuos fosforilados diferentes y resulta esencial para el NHEJ productivo del CSR (Callén *et al.*, 2013).

### ✓ Protección de regiones genómicas expuestas a estrés replicativo:

*53BP1* lleva a cabo esta función a través de la formación de los cuerpos nucleares de *53BP1* (*53BP1 NBs*, *53BP1 nuclear bodies*) (Lukas *et al.*, 2011). Se trata de focos de *53BP1* de gran tamaño observados durante la fase G1 en cierto número de núcleos celulares e incrementados con estrés replicativo (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas C. *et al.*, 2011). Los *53BP1 NBs* también se han denominado dominios *53BP1-OPT*, ya que también contienen componentes de los previamente caracterizados dominios OPT (Oct-1, PTF, transcripción) (Harrigan *et al.*, 2011).

Estos dominios nucleares, enriquecidos también en otras proteínas de la DDR ( $\gamma$ H2AX, MDC1, etc.), se forman alrededor de lesiones en el ADN generadas durante mitosis en *loci* que no completaron la replicación o que contienen intermediarios de reparación no resueltos asociados con horquillas de replicación dañadas. Estos *loci* incluyen los sitios frágiles comunes (CFS, *common fragile sites*), que son regiones genómicas especialmente propensas a rotura y reorganizaciones debido a replicación del ADN inacabada (Letessier *et*

*al.*, 2011). Si tales *loci* “sub-replicados” entran en mitosis, podrían romperse debido a las fuerzas mecánicas generadas por la hipercondensación de la cromatina (Lukas C. *et al.*, 2011), o, si escapan a la rotura, su ADN enredado puede disolverse por la actividad desconcatenante del complejo BTR (BLM–TOPO–III $\alpha$ –RMI1/2) confinado a los puentes de ADN ultrafinos (UFBs, *ultrafine DNA bridges*) entre cromosomas anafásicos, que son segmentos de ADN concatenado que unen los CFSs entre cromátidas hermanas (Chan *et al.*, 2009).

En cualquier caso, las lesiones en el ADN resultantes de estos procesos son transmitidas a las células hijas y secuestradas en 53BP1 NBs. La depleción de 53BP1 o de RNF168 causa acumulación de extremos de ADN no reparados en sitios frágiles expuestos a estrés replicativo, indicando que la formación de 53BP1 NBs puede proteger estos *loci* contra erosión por nucleasas (Lukas C. *et al.*, 2011). Como resultado de su origen, los 53BP1 NBs tienden a ser simétricos en las dos células hijas (Lukas C. *et al.*, 2011). Tal y como predice este modelo, su formación se incrementa en condiciones de estrés replicativo leve (en células U2OS, por tratamiento con afidicolina a 0.2  $\mu$ M) o con la depleción de BLM, mientras que se reduce al deplecionar la condensina SMC2 (Lukas C. *et al.*, 2011).

#### ✓ **Reparación de lesiones heterocromáticas:**

Como vimos en apartados anteriores, ATM promueve la reparación de DSBs localizadas en la heterocromatina mediante la fosforilación de KAP-1. pKAP-1 es transitoriamente pan-nuclear, pero forma focos que colocalizan con  $\gamma$ H2AX en la heterocromatina. Esto requiere la formación previa de focos de 53BP1, que amplifican la acumulación de Mre11–NBS1 en DSBs de reparación tardía como son las heterocromáticas. Esto concentra ATM activa en estas regiones, que fosforila más KAP-1 de forma robusta y localizada, lo que resulta esencial para la reparación de estas lesiones (Noon *et al.*, 2010).

#### ✓ **Inducción de descondensación local de la cromatina:**

53BP1 interacciona con el factor remodelador de la cromatina EXPAND1 (MUM1), que induce descondensación de la misma en los sitios dañados del ADN (Huen *et al.*, 2010b).

#### ✓ **Fusión de telómeros defectuosos:**

Dirige la reparación “errónea” de telómeros disfuncionales carentes de la proteína TRF2 del complejo Shelterina, que normalmente los protege, promoviendo su movilidad en la cromatina para efectuar NHEJ, lo que conlleva fusiones teloméricas (Dimitrova *et al.*, 2008).



### ✓ Regulación transcripcional:

Un estudio propone que 53BP1 y el factor de transcripción SRC3 co-ocupan la misma región del promotor del gen *BRCA1* y son necesarios para su transcripción en células HeLa, lo que podría extenderse a otros genes de componentes de la DDR (Corkery *et al.*, 2011).

### ✓ Control de progresión mitótica a anafase:

Ciertos estudios han sugerido que 53BP1 podría tener este tipo de funciones especializadas en mitosis, fase en la que se ha identificado en los cinetocoros de los cromosomas, colocalizando con la proteína centromérica CENP-E (Jullien *et al.*, 2002).

### ✓ Implicación en la respuesta a ciertos virus:

Reprime la catástrofe mitótica en sincitios originados por la envuelta del HIV-1 (virus del sida) (Perfettini *et al.*, 2010).

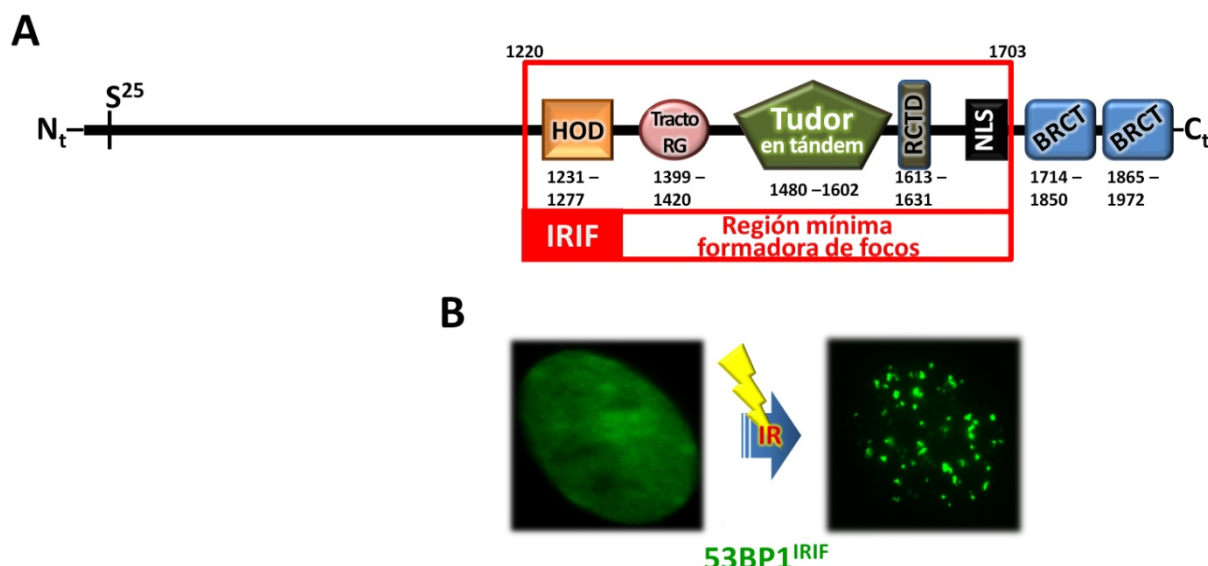


**Figura 6 | Funciones biológicas de 53BP1.** Sus funciones principales en la DDR son promover NHEJ y evitar HR, pero también se han descrito otras muchas.

## 5.4. Arquitectura molecular en dominios de 53BP1

53BP1 humana es una proteína de gran tamaño, de 1972 aminoácidos y unos 217 KDa. Su arquitectura en dominios se ha elucidado mediante análisis bioinformático y diversos estudios de delección. En la Figura 7A puede verse que la proteína consta de los siguientes elementos a lo largo de su secuencia (FitzGerald *et al.*, 2009):



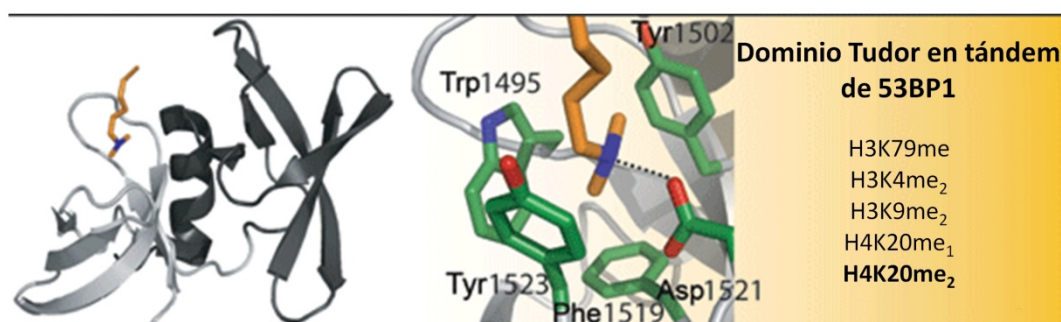


**Figura 7 | Arquitectura molecular en dominios de 53BP1. (A)** Acotación de las diferentes regiones identificadas en la proteína 53BP1 humana. Se representan todos los elementos descritos en el texto, además de uno de sus sitios más importantes de fosforilación por PIKKs, la S<sup>25</sup>. La región amino-terminal presenta desorden estructural intrínseco, no habiéndose descrito en ella elementos destacables. **(B)** Formación de focos por la región mínima formadora de focos (IRIF) de 53BP1. Imágenes de microscopía de fluorescencia del péptido GFP-53BP1<sup>IRIF</sup>. Al aplicar radiación ionizante y (IR), la proteína pasa de una localización pan-nuclear a formar focos discretos en las DSBs.

❖ **Región mínima formadora de focos (IRIF)** (residuos 1220-1703): Es la región mínima de la proteína que se requiere para la formación de focos en respuesta a DSBs del ADN (Figura 7B). Dentro de ella distinguimos los siguientes elementos:

1) **Dominio Tudor en tándem** (residuos 1480-1602): Dos dominios Tudor en tándem que actúan como entidad única. Se une a la cromatina a través del reconocimiento de la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>, vinculando así a la proteína con la Epigenética y la DDR. Esta interacción se produce a través de un bolsillo hidrofóbico de residuos conservados y su base estructural ha sido bien descrita (Corsini y Sattler, 2007) (Figura 8), mostrando que el dominio también es capaz de reconocer, aunque con mucha menor afinidad, las marcas H4K20me<sub>1</sub> y H3K79me, además de otras no relacionadas con la DDR, tales como H3K4me<sub>2</sub> y H3K9me<sub>2</sub>. El dominio pertenece a la superfamilia de dominios Tudor (Familia Royal) (Maurer-Stroh *et al.*, 2003), que engloba una serie de dominios de unión a histonas metiladas en lisina que presentan en común el motivo denominado plegamiento-OB (OB-fold, de unión a oligonucleotidos, *oligonucleotide-binding*): Tudor, Tudor en tándem, PWWP, MBT, Chromo, Chromo Shadow, SMN, Agenet (de plantas), Agenet-like y 7 KD DBD (dominio de unión a DNA de 7 KDa, *7 KDa DNA-binding domain*, de arqueobacterias) (Taverna *et al.*, 2007). El hecho de que este dominio reconozca lisinas dimetiladas es el responsable de la interacción *in vitro* entre 53BP1 y p53, ya que esta

última también presenta esta modificación postraducciona (p53K382me<sub>2</sub>) (Roy *et al.*, 2010).



**Figura 8 | Bases estructurales del reconocimiento Tudor-H4K20me<sub>2</sub>.** Estructura molecular del dominio Tudor en tándem de 53BP1, obtenida por cristalografía y difracción de rayos X. Detalle de las interacciones de los residuos de su bolsillo hidrofóbico con H4K20me<sub>2</sub>. Se destacan los aminoácidos importantes para este reconocimiento, resultando crítico el D<sup>1521</sup>. Se realizaron estudios similares con péptidos conteniendo otras marcas, como H4K20me<sub>1</sub>, H3K79me, H3K4me<sub>2</sub> y H3K9me<sub>2</sub>, obteniéndose mucha menor afinidad en la interacción. (Adaptado de Corsini y Sattler, 2007.)

- 2) **Región RCTD (Región carboxi-terminal al dominio Tudor, *region carboxy-terminal to Tudor domain*)** (residuos 1613-1631): Facilita la formación de focos.
  - 3) **Dominio de homo-oligomerización (HOD, *homo-oligomerization domain*)** (residuos 1231-1277): Facilita la formación de focos posibilitando la homo-oligomerización de 53BP1 (Zgheib *et al.*, 2009). Ésta ha demostrado resultar esencial para CSR (Bothmer *et al.*, 2011), pero no para la fusión de telómeros disfuncionales (Lottersberger *et al.*, 2013).
  - 4) **Tracto RG (RG-Stretch) (GAR, *glycine-arginine rich*)** (residuos 1399-1420): Región rica en residuos de Arg y Gly. No resulta esencial para la formación de focos. Es metilada por la enzima PRMT1 (proteína arginina *N*-metiltransferasa 1, *protein arginine N-methyltransferase 1*), aunque esto no afecta a la oligomerización (Adams *et al.*, 2005).
  - 5) **Señal de localización nuclear (NLS, *nuclear location signal*)**: Posibilita que la proteína sea importada al núcleo.
- ❖ **Dominios BRCT en tándem** (residuos 1714-1850 y 1865-1972): Dos dominios BRCT en tándem situados en el extremo carboxi-terminal de la proteína, fuera de la región IRIF. No intervienen en la formación de focos y ni siquiera se unen a  $\gamma$ H2AX (Ward *et al.*, 2006). Disparan la señalización *downstream* vía unión a fosfopéptidos.
  - ❖ **Región N<sub>t</sub>** (residuos 1 a 1220): Esta amplia región amino-terminal de la proteína no resulta esencial para su reclutamiento a las DSBs ni para la formación de focos. Las predicciones bioinformáticas indican que presenta desorden estructural intrínseco.

- ❖ **Sitios consenso de fosforilación por PIKKs ([S/T]Q):** 32 sitios distribuidos en su mayoría a lo largo de toda la región amino-terminal anterior a la región IRIF. Al menos en 11 de ellos se ha identificado fosforilación tras tratamiento con radiación ionizante: S<sup>6</sup>, S<sup>25</sup> (el más conocido), S<sup>29</sup>, S<sup>166</sup>, S<sup>176</sup>/S<sup>178</sup>, T<sup>302</sup>, S<sup>452</sup>, S<sup>831</sup>, S<sup>1219</sup>, S<sup>1778</sup> (también importante, en el extremo C-terminal) (Jowsey *et al.*, 2007; Lee J. *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009).
- ❖ **Sitios consenso de fosforilación por CDKs ([S/T]P):** 41 sitios, también en la región amino-terminal anterior a IRIF. Sólo se conocen cuatro de ellos fosforilados, aunque su función aún es desconocida (Jowsey *et al.*, 2007).

## 5.5. Formación de focos de 53BP1: Modelo clásico

El *modelo clásico* para la formación de focos de 53BP1 se basa en la unión directa de la proteína a las DSBs. Esto ha de ser compatible con el hecho experimental de que la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> es altamente abundante, suponiendo más del 80% de histona H4 total en células de mamífero. Además, está presente a lo largo de todo el genoma independientemente de la presencia de daño en el ADN, lo cual ha sido sobradamente demostrado por ChIP-*on-chip*, ChIP-seq y tinción inmunofluorescente (con localización pan-nuclear para esta marca de histonas) (Pesavento *et al.*, 2008; Schotta *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008).

La mayoría de H4K20me<sub>2</sub> se establece en ausencia de daño en el ADN a través de la monometilación de H4 de nueva síntesis en K<sup>20</sup> por la histona metiltransferasa SET8 (SETD8, PR-Set7, SET07, KMT5A) y sucesiva monometilación de H4K20me<sub>1</sub> por las histona lisina-metiltransferasas (HKMTs, *histone lysine-methyltransferases*) Suv4-20h1 (SUV420H1, KMT5B) y Suv4-20h2 (SUV420H2, KMT5C) (homólogos 1 y 2 del supresor de variegación 4-20, *suppressor of variegation 4-20 homologues 1 & 2*) para formar H4K20me<sub>2</sub> y H4K20me<sub>3</sub> durante la progresión normal del ciclo celular (Rice *et al.*, 2002; Pesavento *et al.*, 2008; Schotta *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Oda *et al.*, 2009; Brustel *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2012). En contraste con otras modificaciones de histonas, como γH2AX, que se inducen por daño en el ADN (Ismail y Hendzel, 2008), los niveles globales de H4K20me<sub>2</sub> no parecen cambiar tras daño en el ADN (Botuyan *et al.*, 2006).

Este *modelo clásico* fue propuesto, de manera independiente y con algunas diferencias, por Thanos Halazonetis (2004, unión Tudor-H3K79me) (Huyen *et al.*, 2004), Tony Kouzarides (2004, unión Tudor-H4K20me) (Sanders *et al.*, 2004) y Junjie Chen (2006, unión Tudor-H4K20me<sub>2</sub>) (Botuyan *et al.*, 2006). Actualmente se admite que, en mamíferos, la unión efectiva es Tudor-H4K20me<sub>2</sub>.

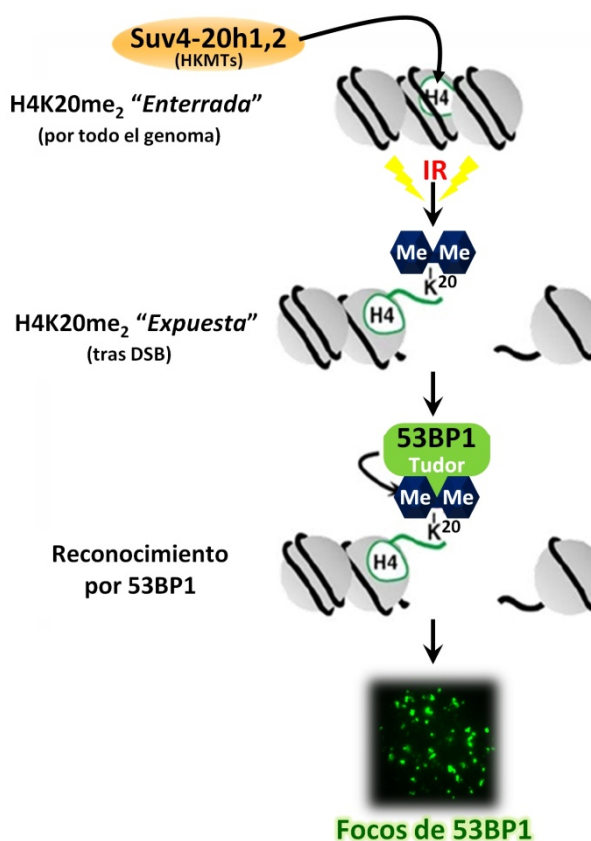
Según este modelo (Figura 9), sin daño en el ADN, la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>, distribuida a lo largo de toda la cromatina, permanece oculta, “enterrada” en la estructura del nucleosoma, de forma que es inaccesible para la proteína 53BP1. Cuando ocurren las DSBs, la marca queda expuesta

en los sitios de rotura, permitiendo su reconocimiento por 53BP1 a través de su dominio Tudor en tándem, que es reclutada y forma focos, conduciendo ello finalmente a las funciones características de 53BP1.

Cabe resaltar que este modelo es puramente especulativo, con escasas evidencias experimentales que muchas veces se ponen en entredicho. Thanos Halazonetis asegura que el *knock-down* (KD) de hDot1L/KMT4 (DOT1L) (enzima que cataliza la metilación de H3K79) en células U2OS reduce la formación de focos de 53BP1, que el dominio Tudor en tándem por sí solo es capaz de formar focos, y que el mutante puntual 53BP1<sup>D1521R</sup> (residuo esencial del dominio Tudor implicado en la unión a la metilación) no los forma (Huyen *et al.*, 2004). Junjie Chen aporta datos estructurales y asegura que, *in vitro*, el dominio Tudor en tándem sólo

reconoce eficientemente H4K20me<sub>2</sub> y con muy baja afinidad H3K79me, lo cual se corrobora *in vivo*: En células HeLa (y demostrado posteriormente en otras líneas (FitzGerald *et al.*, 2011)), el *knock-down* de hDot1L no tiene efecto sobre los focos de 53BP1, mientras que el *knock-down* de SET8 los elimina (Botuyan *et al.*, 2006).

### Modelo Clásico: Unión directa a DSBs (T. Halazonetis, T. Kouzarides, J. Chen)



**Figura 9 | Modelo clásico de formación de focos de 53BP1.** La proteína se uniría a las DSBs de forma directa a través del reconocimiento por su dominio Tudor en tándem de la marca constitutiva H4K20me<sub>2</sub>, que quedaría expuesta sólo cuando se produce el daño.

## 5.6. Inconsistencias y necesidad de revisión del modelo clásico

En el momento de inicio de esta tesis doctoral se detectaron ciertas evidencias experimentales que contradicen el *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1:

- Los *knock-downs* de SET8 y de Suv4-20h, tanto por separado como en combinación, mediante siRNAs y shRNAs (laboratorio de Inestabilidad Genómica, CNIO, 2007) no logran eliminar los focos de 53BP1, sino que éstos se forman de modo ineficiente: Son más pequeños, aparecen en menor número y se forman más lentamente.

- b) El ratón doble *knock-out* (DKO) para *Suv4-20h1,2* (o doble nulo, dn, *double-null*) (Thomas Jenuwein, 2008) (Schotta *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008) es perinatalmente letal y muestra serios problemas de inestabilidad genómica. En él se han perdido la práctica mayoría de los estados H4K20me<sub>2</sub> y H4K20me<sub>3</sub> con transición completa de toda la cromatina hacia un estado H4K20me<sub>1</sub>. En sus fibroblastos embrionarios (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*, fibroblastos embrionarios de ratón) no se aprecia desaparición de focos de 53BP1, como cabría esperar, sino que éstos se forman también de manera ineficiente.

Por tanto, se consideró preciso someter a revisión dicho modelo y proponer otro que explique estos hechos. Una primera idea muy sugerente se basaría en que en realidad la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> y su reconocimiento por el dominio Tudor en tándem de 53BP1 no son esenciales para la formación de focos de esta proteína, si bien posibilitan que ésta se lleve a cabo de forma eficiente, posiblemente permitiendo la localización constitutiva de la proteína en la cromatina.

## 6. Relaciones entre la DDR y la citocinesis

Como se verá en el apartado correspondiente a Resultados, los estudios llevados a cabo con la proteína 53BP1 durante el desarrollo de la presente tesis doctoral condujeron a centrar nuestra atención en su intervención en una posible DDR asociada a citocinesis, así como a la identificación y caracterización de esta última. Por este motivo, es preciso introducir aquí estos procesos y las evidencias que nos llevaron a formular nuestras hipótesis.

### 6.1. La DDR en mitosis

La DDR ante DSBs en mitosis presenta ciertas peculiaridades con respecto a la que se desarrolla en interfase (Giunta y Jackson, 2011):

#### 1) Activación exclusiva de la “DDR primaria”:

La cascada de señalización activada por DSBs en mitosis está truncada, mostrando únicamente los componentes apicales de la DDR (“DDR primaria”) (Giunta y Jackson, 2011): Activación de PIKKs (ATM y DNA-PKcs), reclutamiento del complejo MRN y de MDC1, y fosforilación  $\gamma$ H2AX (Giunta *et al.*, 2010).

La activación únicamente de la “DDR primaria” ( $\gamma$ H2AX, MRN, MDC1) en células mitóticas tendría la función de favorecer el reconocimiento y la reparación del daño mitótico en el ADN en la fase G1 del siguiente ciclo celular, ayudando así a mantener la integridad genómica y promoviendo supervivencia celular (Giunta y Jackson, 2011). Así,  $\gamma$ H2AX marcaría las lesiones en mitosis para este reconocimiento posterior, acelerando el reclutamiento de los factores de la DDR. Por su parte, el

complejo MRN ayudaría a mantener unidos los extremos rotos del ADN, a través de la actividad de unión de extremos de ADN de su componente MRE11, que forma “puentes” entre ellos (Williams *et al.*, 2008). Esto resultaría especialmente relevante en lesiones complejas, ya que las más simples podrían mantenerse unidas en la cromatina mitótica altamente compactada (Giunta y Jackson, 2011).

## 2) Inactivación de la “DDR secundaria”:

Los componentes posteriores de la DDR (“DDR secundaria”) no aparecen en mitosis: No están presentes las cascadas de ubiquitinación por RNF8 y RNF168, no se produce el reclutamiento a las DSBs de proteínas mediadoras como BRCA1 y 53BP1, y tampoco se lleva a cabo la activación de las kinasas de *checkpoint* CHK1 y CHK2 (Giunta *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2010). Más aún, 53BP1 es excluida activamente de las DSBs que se generan una vez superada la transición G2/M (Nelson *et al.*, 2009), lo cual podría llevarse a cabo por las hiperfosforilaciones específicas de mitosis típicas de muchas proteínas de la DDR (Poon, 2007). Por el contrario, RNF8 y RNF168 son reclutadas a los focos de daño en el ADN en mitosis tardía, a partir de telofase, presumiblemente para preparar a nivel de cromatina sitios para el reclutamiento de 53BP1 en G1 temprana (Giunta *et al.*, 2010). No obstante, 53BP1 aún no es reclutada a estos focos de RNF8-RNF168 en mitosis tardía, haciéndolo sólo en G1 temprana (Giunta *et al.*, 2010).

La inactivación mitótica de la “DDR secundaria” (ubiquitinaciones y fosforilaciones) podría explicarse por sus consecuencias deletéreas, por lo que se prioriza la progresión mitótica a la activación de una DDR completa. En el complejo escenario mitótico donde la envuelta nuclear está desintegrada y la cromatina se encuentra totalmente compactada, la activación de una DDR completa haría que los eventos remodeladores de cromatina resultantes dismantelaran localmente los cromosomas mitóticos, lo que podría interferir con su segregación. Por otra parte, la activación de los *checkpoints* de daño en el ADN sería incompatible con el desarrollo correcto de la mitosis (Giunta y Jackson, 2011).

## 3) Relocalización específica de proteínas de la DDR:

Aunque RNF8, RNF168 y 53BP1 son excluidas de las DSBs durante la mayor parte de la mitosis, se asocian con estructuras mitóticas tales como los cinetocoros (Jullien *et al.*, 2002), lo que sugiere que estos factores de la DDR podrían desempeñar algún tipo de función durante la división celular. RNF8 también se asocia a otras estructuras mitóticas, como los centrosomas (Giunta *et al.*, 2010) y el *midbody*, donde se cree que regula salida mitótica (Tuttle *et al.*, 2007; Plans *et al.*, 2008). Esto mismo ocurre con otras proteínas de la DDR, como ATM, ATR, DNA-PKcs, p53, TopBP1, BRCA1, CHK1 y CHK2, que se asocian con los centrosomas en mitosis (Hsu y White, 1998; Tsvetkov *et al.*, 2003; Reini *et al.*, 2004; Tritarelli *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). En el caso de 53BP1, se carga al cinetocoro durante profase, donde colocaliza con CENP-E, y en metafase se libera sólo si todos los cromosomas están alineados correctamente en la placa ecuatorial, por lo que 53BP1 podría tener un papel fisiológico controlando la progresión mitótica a anafase (Jullien *et al.*, 2002). De hecho, en *Xenopus*



X53BP1 (el ortólogo de 53BP1) se ha identificado como un supresor de catástrofe mitótica (Xia *et al.*, 2001).

#### 4) Ausencia de los *checkpoints* convencionales de daño en el ADN:

Como consecuencia de la inactivación de la “DDR secundaria”, en mitosis existe por tanto ausencia de *checkpoints* de daño en el ADN (Giunta y Jackson, 2011). Las kinasas de *checkpoint* CHK1 y CHK2 no se fosforilan por ATM en sus sitios diana, S<sup>345</sup> y T<sup>68</sup>, respectivamente (Giunta *et al.*, 2010), a pesar de que la activación de ATM por daño tenga lugar (Giunta *et al.*, 2010; van Vugt *et al.*, 2010). La ausencia de fosforilación de CHK2 en T<sup>68</sup> en mitosis se cree debida a fosforilación de CHK2 por la kinasa mitótica PLK1 (kinasa similar a Polo 1, *Polo-like kinase 1*) (van Vugt *et al.*, 2010). Por otra parte, la fosforilación de 53BP1 por CDK1 en S<sup>380</sup> durante mitosis se requiere para su unión a PLK1, por lo que 53BP1 podría actuar atrayendo a PLK1 para que ésta inactivara a CHK2 (van Vugt *et al.*, 2010). La incapacidad de 53BP1 para reclutarse a focos de daño en el ADN en mitosis y la ausencia asociada de fosforilación de 53BP1 en S<sup>25</sup> mediada por ATM en células mitóticas dañadas se correlaciona no sólo con la ausencia de activación de CHK2, sino también con la ausencia de fosforilación de otras dianas de ATM, incluyendo CHK1 y SMC1 (Giunta *et al.*, 2010). No obstante, otros sustratos de ATM aparecen fosforilados, como KAP-1 (S<sup>824</sup>) y MDC1 (T<sup>719</sup>), quizá porque presentan diferentes requerimientos o límites para su mantenimiento (Giunta *et al.*, 2010).

La ausencia en mitosis de los *checkpoints* convencionales de daño en el ADN se explicaría por el hecho de que si en mitosis las DSBs los activaran, se retrasaría la progresión mitótica, conduciendo a la descoordinación de eventos mitóticos que han de estar precisamente regulados en el tiempo, lo que finalmente induciría en las células hijas aneuploidía y/o catástrofe mitótica (Giunta y Jackson, 2011). También se ha propuesto que la activación de estos *checkpoints* en mitosis podría conducir a la inactivación prematura del complejo Ciclina B-CDK1, resultando en salida mitótica aberrante y tetraploidía (van Vugt *et al.*, 2010). Evitar esta última es de vital importancia para los organismos pluricelulares, ya que las inestables células tetraploides pueden ser precursores de las células cancerosas aneuploides (Giunta y Jackson, 2011).

#### 5) *Checkpoint* de antefase:

Sin embargo, se ha identificado un *checkpoint* de antefase (*antephase checkpoint*) en células de vertebrados por el que se puede retrasar la mitosis e incluso revertir la progresión mitótica ante exposición a daño en el ADN por radiación ionizante (Pines y Rieder, 2001; Matsusaka y Pines, 2004; Chin y Yeong, 2010). Este nuevo *checkpoint* se da en el denominado estadio de “antefase”, un punto entre G2 tardía y profase media en el que la condensación de la cromatina está teniendo lugar de forma activa para la entrada en mitosis y la división celular (Pines y Rieder, 2001; Matsusaka y Pines, 2004; Chin y Yeong, 2010). De este modo, el *checkpoint* de antefase complementaría al previo *checkpoint* G2/M (que monitoriza la ausencia de daño en el ADN antes de proceder a mitosis) y al posterior

*checkpoint* de ensamblaje del huso (SAC, *spindle assembly checkpoint*) (que, en metafase, asegura el ensamblaje correcto de los microtúbulos en los cinetocoros de los cromosomas mitóticos antes de permitir la transición a anafase). El *checkpoint* de antefase está mediado principalmente por las quinasas p38 de respuesta a estrés y la E3-ubiquitina ligasa CHFR, que señala a través de ubiquitinaciones (Matsusaka y Pines, 2004).

Tras antefase, las células de mamífero están comprometidas a completar la mitosis incluso en presencia de daño en el ADN (Rieder y Cole, 1998), indicando que las DSBs de por sí no dificultan la progresión mitótica ni disparan los *checkpoints* del ciclo celular (Rieder y Salmon, 1998). No obstante, la velocidad de la progresión mitótica puede verse afectada por la cantidad del daño en el ADN: Niveles relativamente bajos no retrasan la salida de fase M, pero niveles más elevados de daño pueden interferir con la estructura y función de los cinetocoros, resultando en una mitosis significativamente prolongada debido a la necesidad de satisfacer el SAC (Mikhailov *et al.*, 2002).

## 6.2. Citocinesis

La citocinesis es el proceso por el cual la célula mitótica se divide físicamente para dar lugar a dos células hijas, tras la segregación cromosómica (Fededa y Gerlich, 2012). Puede dividirse en dos estadios diferenciados en el tiempo: Citocinesis temprana y abscisión citocinética (Figura 10).

### a) Citocinesis temprana:

La citocinesis de la célula animal (Figura 10) se inicia durante la anafase, cuando el huso mitótico se reorganiza para formar una densa agrupación de microtúbulos antiparalelos situados entre los dos ásteres centrosomales, denominada huso central (*central spindle*) o zona media del huso (*spindle midzone*). Junto con microtúbulos de los ásteres del huso, el huso central define la posición del plano de división entre los cromosomas segregados.

Esta señal espacial es transmitida a través de una ruta que implica a la GTPasa pequeña RhoA, conduciendo al ensamblaje de un anillo contráctil de actomiosina en la corteza celular ecuatorial. La ruta se inicia por la quinsa mitótica PLK1 (quina similar a Polo 1, *Polo-like kinase 1*), que permite el reclutamiento del RhoGEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina, *guanine nucleotide-exchange factor*) ECT2 al huso central, a través de su interacción con HsCyk-4, su activador y anclador a esta región. Esto promueve la activación local de RhoA, lo que induce el ensamblaje del anillo contráctil y su contracción (Petronczki *et al.*, 2007).

La contracción del anillo de actomiosina resulta en la ingresión de la membrana plasmática asociada para formar un surco de división (*cleavage furrow*) o surco citocinético (*cytokinetic furrow*), que divide el citoplasma en dos dominios, cada uno para una futura célula hija. De forma independiente a PLK1, otra quinsa mitótica, Aurora B (AURKB, *Aurora kinase B*), cuando se localiza



en el huso central controla la ingresión del surco citocinético a través de rutas que implican la fosforilación de MKLP1 (proteína similar a la kinesina mitótica 1, *mitotic kinesin-like protein 1*) (Guse *et al.*, 2005; Neef *et al.*, 2006). Intervienen también en este paso otras proteínas como la Centralspindlina y la Anillina (Agromayor y Martín-Serrano, 2013).

En este estadio, las células hijas hermanas permanecen conectadas por un estrecho puente intercelular que contiene densos haces antiparalelos de microtúbulos que se solapan en una región central denominada cuerpo medio o *midbody* (Fededa y Gerlich, 2012).

## **b) Abscisión citocinética:**

La separación física de las células hijas se lleva finalmente a cabo por fisión de la membrana plasmática en el puente intercelular (Fededa y Gerlich, 2012; Agromayor y Martín-Serrano, 2013). Este paso final de la citocinesis se denomina abscisión citocinética (Guizetti y Gerlich, 2010). Antes de que ocurra, la mayoría de tipos celulares animales permanecen conectados por el puente intercelular durante hasta varias horas antes de separarse por abscisión (Fededa y Gerlich, 2012).

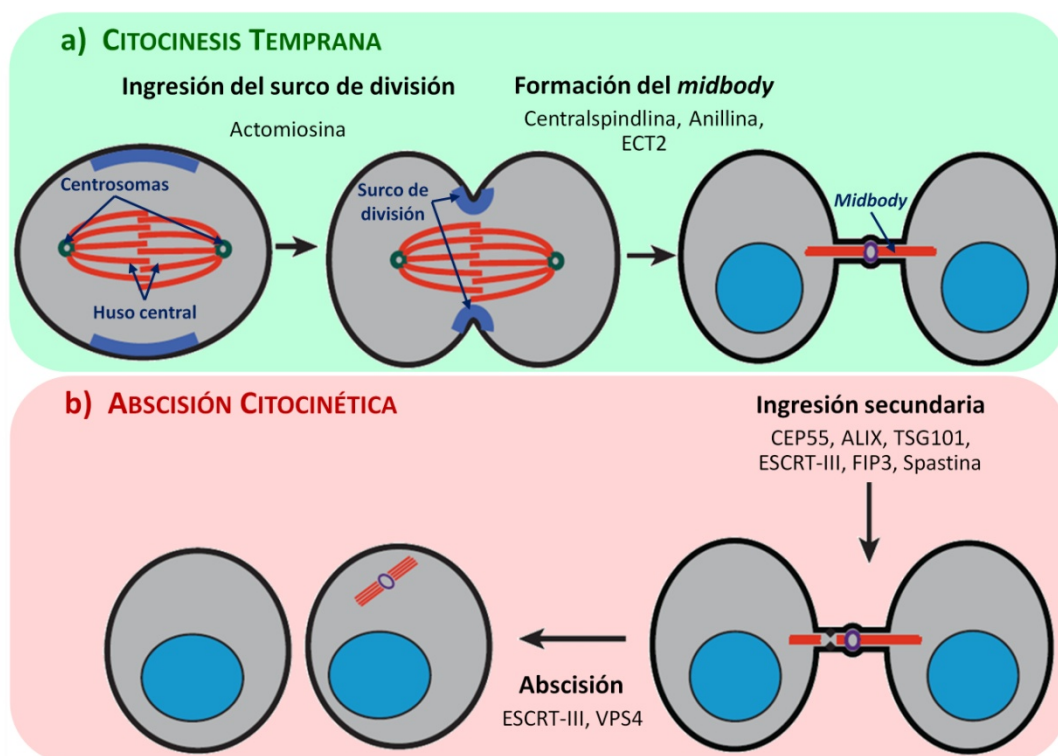
La abscisión citocinética es un proceso independiente de actina que comienza por una ingresión secundaria. Ésta transcurre por eliminación de las estructuras citoesqueléticas del puente intercelular, constricción del córtex celular y fisión de la membrana plasmática (Steigemann y Gerlich, 2009; Guizetti y Gerlich, 2010; Fededa y Gerlich, 2012). Se trata de un proceso complejo y altamente regulado en el que destaca como factor esencial el complejo ESCRT-III (complejo de clasificación endosómica requerido para el transporte, *endosomal sorting complex required for transport*) y que está controlado por PLK1. En la salida mitótica, el complejo APC/C (complejo promotor de anafase/ciclosoma, *anaphase-promoting complex/cyclosome*) degrada a PLK1, lo que impide que ésta fosforile inhibitoriamente a CEP55 (proteína centrosomal de 55 KDa, *centrosomal protein of 55 kDa*), que puede entonces salir del centrosoma y unirse al componente del *midbody* MKLP1 (Bastos y Barr, 2010). CEP55 recluta entonces a ALIX al *midbody*. ALIX es un factor que direccionaliza al complejo ESCRT-III al *midbody* (Carlton y Martín-Serrano, 2007; Morita *et al.*, 2007; Carlton *et al.*, 2008). Además, otros factores también contribuyen a direccionalizar a ESCRT-III al sitio de abscisión, incluyendo TSG101 (Carlton y Martín-Serrano, 2007), FIVE-CENT (Sagona *et al.*, 2010), MITD1 (Hadders *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012) y FIP3 (Horgan *et al.*, 2012; Schiel *et al.*, 2012).

ESCRT-III se acumula así en las regiones corticales adyacentes al *midbody* durante telofase tardía (Elia *et al.*, 2011; Guizetti *et al.*, 2011). El complejo ESCRT-III media la deformación y escisión de la membrana desde la cara citosólica en diversos procesos biológicos relacionados con el tráfico activo de membranas. Esto es llevado a cabo gracias a la polimerización de sus subunidades, las proteínas CHMPs (proteínas del cuerpo multivesicular cargado, *charged multivesicular body proteins*), que se ensamblan en filamentos helicoidales de 17 nm de diámetro y proporcionan una fuerza de constricción (Carlton y Martín-Serrano, 2007; Morita *et al.*, 2007; Carlton *et al.*, 2008; Guizetti *et al.*,

2011). Las CHMPs polimerizan en filamentos en un proceso secuencial de varios pasos ordenados en el que se diferencian tres estadios: Nucleación, polimerización y encapuchado (*capping*). CHMP6 es el nucleador del filamento, CHMP4 la subunidad principal del polímero, y CHMP2 y CHMP3 constituyen la capucha del filamento (Agromayor y Martín-Serrano, 2013).

Entre otros, uno de los procesos clave que lleva a cabo el complejo ESCRT-III se basa en la interacción de su subunidad CHMP1B con la proteína Spastina (*Spastin*) a través del dominio MIT (dominio de interacción y tráfico de microtúbulos, *microtubule-interacting and -trafficking domain*) de ésta (Yang D. *et al.*, 2008). La Spastina tiene actividad cortadora de microtúbulos, lo que, junto al tráfico vesicular de membranas, permite que se complete la abscisión citocinética (Connell *et al.*, 2008).

Finalmente, tras la escisión de las membranas, se produce el desensamblaje de los complejos gracias a VPS4 (clasificación de proteínas vacuolares 4, *vacuolar protein sorting 4*). Se trata de una ATPasa de la familia AAA que interacciona con ESCRT-III, resultando esencial para la función de este complejo (Agromayor y Martín-Serrano, 2013).



**Figura 10 | Citocinesis en células animales.** Diagrama esquemático con los principales procesos que tienen lugar en la citocinesis de células animales. Estos acontecimientos se han separado mecánicamente en citocinesis temprana y abscisión citocinética. En cada paso, se indican los factores clave que intervienen, además de señalarse ciertas estructuras celulares significativas. (Adaptado de Agromayor y Martín-Serrano, 2013.)

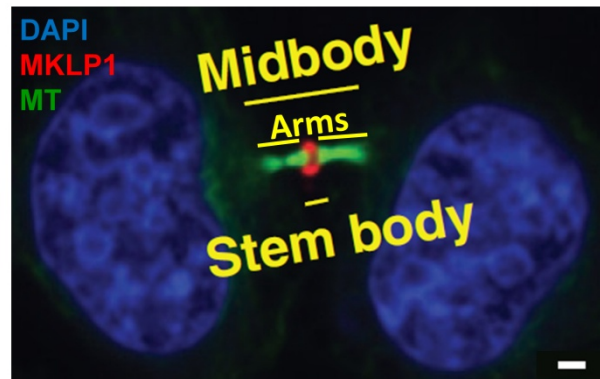
### 6.3. El *midbody*: Una estructura asociada a abscisión citocinética

La estructura característica de la abscisión citocinética resulta ser el *midbody* o cuerpo medio. Localizado en el puente intercelular entre las dos células hijas en separación, se sitúa en la zona de solapamiento entre los haces densos de microtúbulos antiparalelos derivados del huso central (Fededa y Gerlich, 2012). Morfológicamente, pueden distinguirse dos regiones en el *midbody* (Hu *et al.*, 2012) (Figura 11): El cuerpo de Flemming (*Flemming body*) o cuerpo troncal (*stem body*), y los brazos (*arms*) o ramas (*branches*).

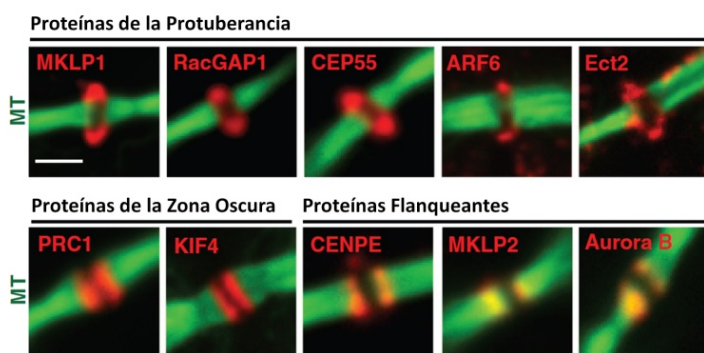
La zona central del *midbody* se denomina cuerpo de Flemming (*Flemming body*) o cuerpo troncal (*stem body*) (Hu *et al.*, 2012). Se trata de una matriz densa a los electrones de composición desconocida. Se cree que ésta viene dada por las más de 100 proteínas diferentes que se encuentran en el puente intercelular, como han puesto de manifiesto ciertos estudios proteómicos del *midbody* (Skop *et al.*, 2004; Bonner *et al.*, 2011). Puede dividirse en dos regiones: Una zona oscura (*dark zone*) central, la más densa al paso de los electrones; y la protuberancia (*bulge*), dada por dos pequeños salientes sobre ella localizados antiparalelos a los haces de microtúbulos (Hu *et al.*, 2012).

La otra parte del *midbody* son los brazos (*arms*) o ramas (*branches*) (Hu *et al.*, 2012). Se trata de los dos haces densos de microtúbulos antiparalelos derivados del huso central, transcurriendo antiparalelos a ambos lados del cuerpo de Flemming, en el interior del puente intercelular que conecta a las dos células en separación. Contienen una de las proteínas más características que se encuentran en el *midbody*, la kinasa Aurora B (AURKB, *Aurora kinase B*), que constituye un buen marcador del *midbody* (Eggert *et al.*, 2006; Ruchaud *et al.*, 2007). Aurora B lleva a cabo funciones esenciales en citocinesis.

En función de esta estructura, las proteínas del *midbody* pueden clasificarse en función de su patrón de localización por inmunofluorescencia en tres grupos: Proteínas de la protuberancia (MKLP1, RacGAP1, CEP55, ARF6, ECT2); proteínas de la zona oscura (PRC1, KIF4); y proteínas flanqueantes (CENP-E, MKLP2, Aurora B), que discurren por las ramas flanqueando al cuerpo de Flemming (Hu *et al.*, 2012). En la Figura 12 se muestran ejemplos de tales localizaciones.



**Figura 11 | Estructura del *midbody*.** Tinción inmunofluorescente de células HeLa. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). El cuerpo troncal (*stem body*) o cuerpo de Flemming del *midbody* está marcado por la proteína MKLP1 (rojo), localizada en la protuberancia. La zona oscura (*dark zone*) puede apreciarse justo en el centro. Los brazos (*arms*) o ramas vienen dados por los microtúbulos (MT) (verde). Barra de escala, 3  $\mu\text{m}$ . (Adaptado de Hu *et al.*, 2012.)



**Figura 12 | Clasificación de las proteínas del *midbody* en función de su localización por inmunofluorescencia.** Tinción inmunofluorescente de células HeLa. En verde, los microtúbulos (MT) marcan las ramas del *midbody*, mientras que el resto de proteínas de han teñido en rojo. Barra de escala, 3  $\mu$ m. (Adaptado de Hu *et al.*, 2012.)

Sin embargo, la función específica de muchos componentes del *midbody* aún no está clara. Generalmente, se cree que el *midbody* proporciona una plataforma de anclaje para la maquinaria de abscisión (Fededa y Gerlich, 2012), como ya hemos descrito. Se han propuesto también funciones no citocinéticas para los *midbodies*, tales como especificación de la polaridad (Wilcock *et al.*, 2007; Pollarolo *et al.*,

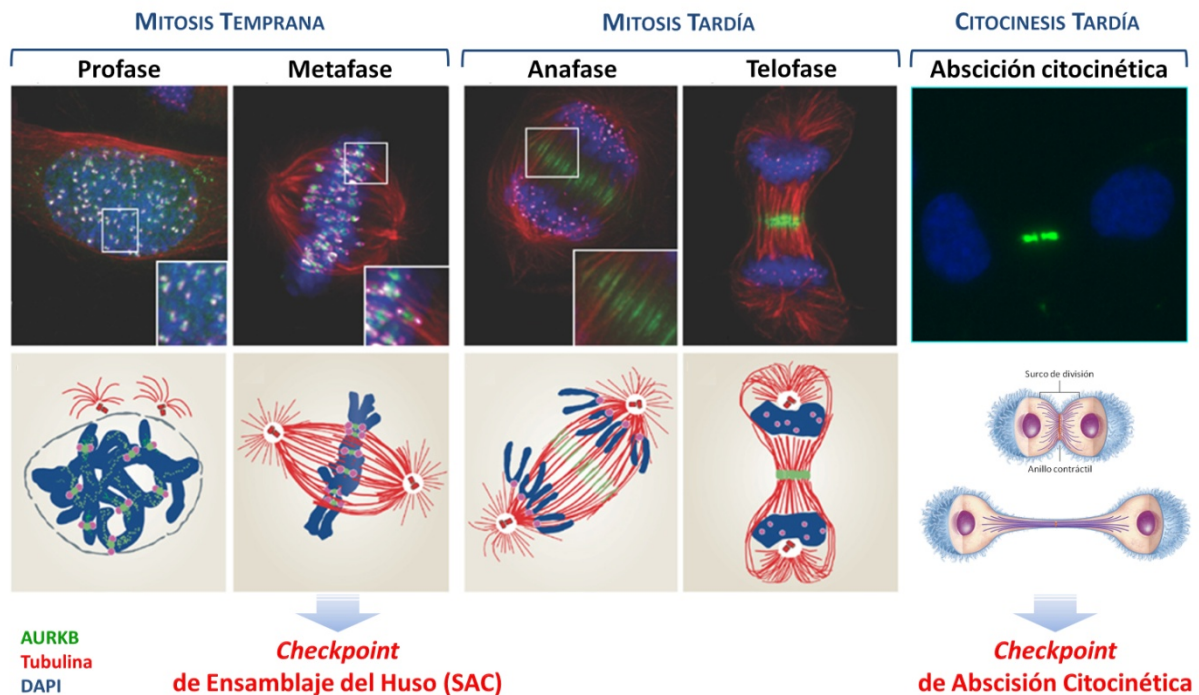
2011), comunicación intercelular (Marzesco *et al.*, 2005; Dubreuil *et al.*, 2007) y determinación del destino celular (Ettinger *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2011).

Tras la abscisión, el *midbody* pasa a ser un remanente post-mitótico. El destino de los remanentes de los *midbodies* depende del tipo celular, siendo el más común la degradación por la vía macroautofágica, aunque también pueden ser liberados al exterior celular o incluso ser “heredados” por una de las células hijas para desempeñar funciones relacionadas con la especificación del destino celular (Chen *et al.*, 2012).

#### 6.4. Aurora B (AURKB) en mitosis y citocinesis

Aurora B (AURKB, *Aurora kinase B*) es una kinasa mitótica esencial para mitosis y citocinesis (Eggert *et al.*, 2006; Ruchaud *et al.*, 2007). Su localización varía a lo largo de mitosis (Ruchaud *et al.*, 2007) (Figura 13). Desde profase temprana se asocia a los cinetocoros en los centrómeros de los cromosomas, aún en formación. En metafase sigue unida a éstos, donde desempeña una función esencial como componente del complejo pasajero cromosómico (CPC, *chromosomal passenger complex*), constituido por las proteínas AURKB, INCENP (asociada a los centrómeros), Survivina y Borealina (Dasra-B). El CPC es el responsable del *checkpoint* de ensamblaje del huso (SAC, *spindle assembly checkpoint*), que, en metafase, asegura el ensamblaje correcto de los microtúbulos en los cinetocoros de los cromosomas mitóticos antes de permitir la transición a anafase, lo que se consigue por la fosforilación por AURKB de la proteína del cinetocoro BubR1. Seguidamente, ya en anafase, Aurora B pasa a localizarse en los microtúbulos de la zona media del huso. Mantiene esta localización en telofase y citocinesis, de forma que queda asociada al *midbody*, ya que éste es una estructura derivada de tales microtúbulos (Ruchaud *et al.*, 2007). Aquí, Aurora B controla la ingresión del surco citocinético a través de rutas que implican la fosforilación de MKLP1 (Guse *et al.*, 2005; Neef *et al.*,

2006). Finalmente, Aurora B permanece en el *midbody* hasta citocinesis tardía, donde es responsable del denominado *checkpoint* de abscisión citocinética (Steigemann *et al.*, 2009).



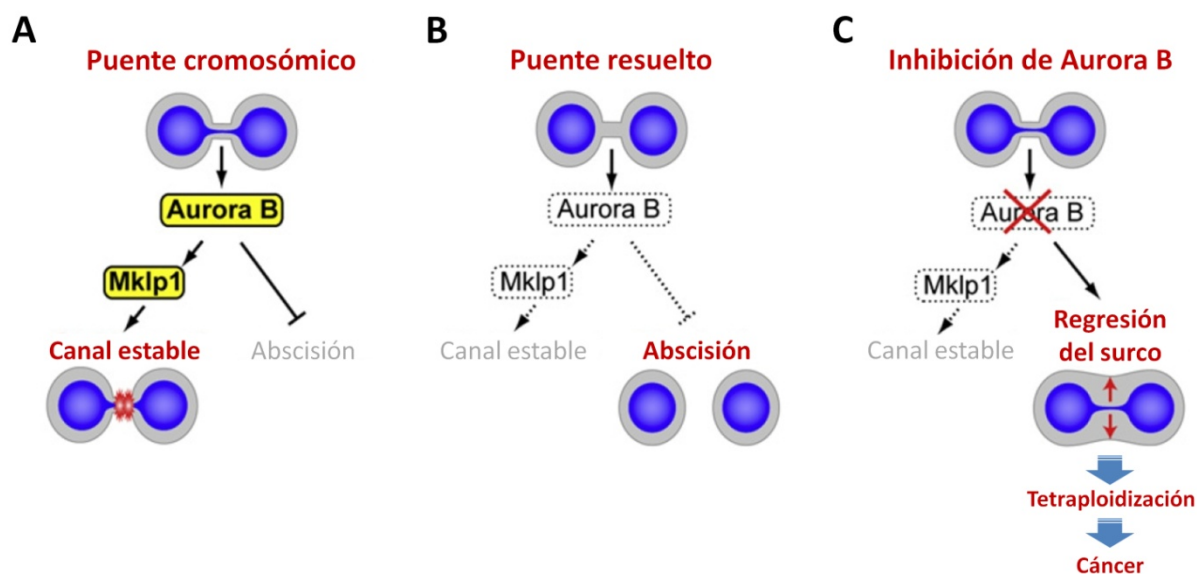
**Figura 13 | Localización de Aurora B en mitosis.** Imágenes de inmunofluorescencia en células HeLa, acompañadas de dibujos que esquematizan cada situación. La tinción de Aurora B (AURKB) se muestra en verde, los microtúbulos (Tubulina) en rojo y el ADN en azul (tinción con DAPI). Como puede observarse, en mitosis temprana Aurora B aparece asociada a los centrómeros en los cinetocoros de los cromosomas, en mitosis tardía se transfiere a la zona media del huso, y en citocinesis pasa a localizarse en el *midbody*, hasta el término de la abscisión citocinética. Aparecen señalados los *checkpoints* de los que Aurora B es responsable, según el punto concreto de la mitosis. (Adaptado de Ruchaud *et al.*, 2007.)

## 6.5. Checkpoint de abscisión citocinética (“Checkpoint NoCut”)

La presencia de Aurora B en el *midbody* tiene una función esencial en el estadio de citocinesis: Establecer el denominado *checkpoint* de abscisión citocinética, por el cual ésta no se produce ante la existencia de puentes cromosómicos entre los dos núcleos hijos (Steigemann *et al.*, 2009) (Figura 14). La presencia de un puente cromosómico sostiene la actividad de Aurora B (autofosforilada en la T<sup>232</sup> de su *loop* de activación (Yasui *et al.*, 2004)) en estadios post-telofásicos, lo que conduce a la fosforilación de MKLP1, la estabilización del canal intercelular por revestimiento con filamentos de actina y el retraso en la abscisión citocinética (Figura 14A). En concreto, se cree que la subunidad CHMP4C del complejo ESCRT-III, que se localiza en el cuerpo de Flemming, podría ser capaz de reconocer la cromatina mal segregada, en cuyo caso, a través de una interacción con Borealina para atraer al CPC, es fosforilada en S<sup>210</sup> por Aurora B, lo que retrasa la abscisión posiblemente previniendo



el ensamblaje de un complejo de abscisión productivo (Carlton *et al.*, 2012). La resolución del puente cromosómico conlleva la eliminación de cromatina del sitio de rotura y la inactivación de Aurora B, lo que desestabiliza el canal intercelular y permite la abscisión (Figura 14B). Así, la inhibición química de Aurora B en presencia de un puente cromosómico desestabilizaría el canal intercelular, lo que permitiría la regresión del surco citocinético y produciría fallo general en la citocinesis, conduciendo a la binucleación y tetraploidización de la célula (Figura 14C).



**Figura 14 | Checkpoint de abscisión citocinética ("Checkpoint NoCut") en mamíferos.** Esquema que representa el mecanismo de este *checkpoint*, cuyo principal ejecutor es la kinasa Aurora B (AURKB). Se detallan tres situaciones posibles, como se describe en el texto. **(A)** En presencia de un puente cromosómico en el canal intercelular entre las dos células hijas en separación, se activa este *checkpoint*, estabilizándose el canal e inhibiéndose la abscisión citocinética. **(B)** Cuando el puente de ADN es resuelto, el *checkpoint* deja de estar activo y tiene lugar la abscisión. **(C)** En el caso de que Aurora B esté inhibida en presencia de puentes cromosómicos, el *checkpoint* no se dispara, pero tampoco puede tener lugar la abscisión debido a la presencia del puente cromosómico. Al no estabilizarse el canal intercelular, se produce la regresión del surco citocinético, lo que finalmente conduce a la generación de una célula binucleada. Estas células tetraploides son muy inestables y se consideran precursoras de las células aneuploides que son la génesis del cáncer. (Adaptado de Steigemann *et al.*, 2009.)

Este *checkpoint* se describió previamente en *Saccharomyces cerevisiae*, denominándose "*checkpoint NoCut*" (Norden *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2009). Se demostró que la presencia de cromatina de la zona media del huso, en concreto sus acetilaciones, activa a Ipl1 (el ortólogo de Aurora B en *S. cerevisiae*) (Mendoza *et al.*, 2009), que a su vez activa a Boi1 y Boi2, las cuales inhiben a las Septinas, las proteínas responsables de la abscisión. Sin embargo, en mamíferos la activación del *checkpoint* por cromatina es sólo una hipótesis formulada en base a que las proteínas CHMP fueron inicialmente descritas como proteínas modificadoras de la cromatina (Stauffer *et al.*, 2001), por lo que se postuló que CHMP4C podría asociarse a la cromatina condensada y mediar la interacción física entre puentes cromosómicos o cromosomas retardados y el complejo ESCRT-III en el *midbody* para la

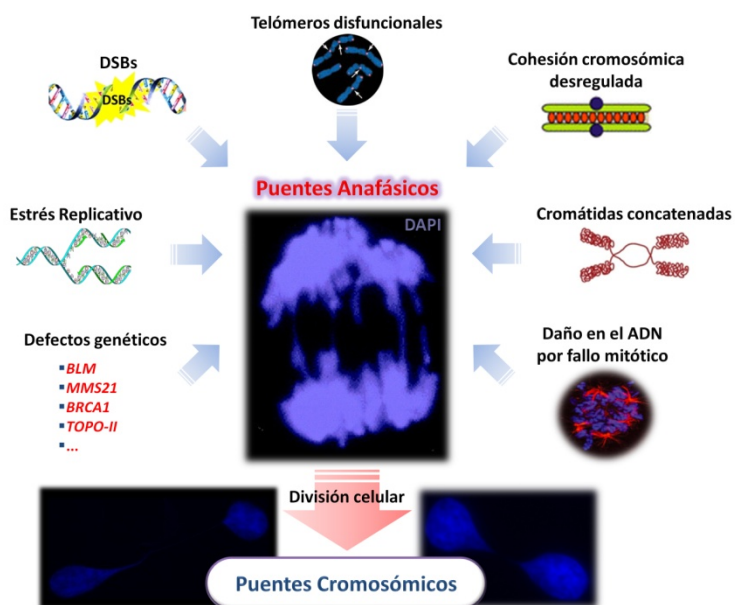
activación del *checkpoint* (Carlton *et al.*, 2012; Agromayor y Martín-Serrano, 2013). Por otra parte los ortólogos en mamíferos de Boi1 y Boi2 de levadura aún no han sido identificados.

Experimentalmente, el *checkpoint* puede activarse por depleción parcial por RNAi (interferencia de ARN, *RNA interference*) de la nucleoporina NUP153 (la que promueve la importación nuclear específica de 53BP1 (Moudry *et al.*, 2012a)), con aparición de multitud de células que no completan la abscisión y permanecen detenidas en estadio de *midbody* (Mackay *et al.*, 2010; Carlton *et al.*, 2012).

En mamíferos, el *checkpoint* de abscisión supone por tanto un mecanismo de control celular para prevenir la tetraploidización en células con problemas de segregación cromosómica (Uetake y Sluder, 2004; Fujiwara *et al.*, 2005; Caldwell *et al.*, 2007; Ganem *et al.*, 2007). Esto resulta de vital importancia en las células animales de organismos pluricelulares, ya que la tetraploidización es uno de los pasos tempranos del desarrollo del cáncer, al ser el origen de las células aneuploides características de éste (Caldwell *et al.*, 2007; Ganem *et al.*, 2007). El modelo implica que Aurora B sería parte de un sensor que responde a la cromatina no segregada presente en el sitio de abscisión, y que en células humanas la abscisión citocinética se coordina con la segregación cromosómica completa (Steigemann *et al.*, 2009).

### Origen de los puentes cromosómicos:

Hay que advertir que, mientras que la segregación cromosómica normalmente se completa pronto tras anafase, puede verse seriamente retrasada por puentes cromosómicos (*chromosome bridges*) o por cromosomas retardados (*lagging chromosomes*). Se ha estimado que estos defectos de segregación ocurren en alrededor del 1% de las células somáticas en división y con mayor incidencia en células transformadas (Gillselsson *et al.*, 2000; Cimini *et al.*, 2003). Aunque los puentes cromosómicos pueden tener orígenes muy diversos (Figura 15), un punto común de partida para su formación es la generación de puentes anafásicos (*anaphase bridges*)



**Figura 15 | Origen de los puentes cromosómicos.** Distintas condiciones generan puentes anafásicos debido a defectos en mitosis. Generalmente, éstos, junto a los cromosomas retardados, suelen dar lugar a puentes cromosómicos entre las dos células hijas en división. Tales estructuras son las responsables de disparar el *checkpoint* de abscisión citocinética ("NoCut"). En las imágenes, el ADN aparece teñido con DAPI (azul).

(Fenech *et al.*, 2011). Los puentes cromosómicos pueden resultar de telómeros disfuncionales que se fusionan (Maser y DePinho, 2002; Stewénus *et al.*, 2005), DSBs (Acilan *et al.*, 2007), cohesión cromosómica desregulada (Chestukhin *et al.*, 2003; Cimini *et al.*, 2003), cromátidas concatenadas (Chan *et al.*, 2007) como consecuencia directa de la replicación del ADN (Sundin y Varshavsky, 1980), estrés replicativo (Chan *et al.*, 2009), ciertos defectos genéticos (en *BLM*, *MMS21*, *BRCA1*, *TOPO-II*, etc.), o incluso deberse a daño en el ADN asociado con fallo en mitosis o en citocinesis por diversos orígenes y mecanismos (Fenech *et al.*, 2011; Crasta *et al.*, 2012; Ganem y Pellman, 2012; Hayashi y Karlseder, 2013).

### 6.6. Evidencias de relaciones entre la DDR, la mitosis y la citocinesis

Hasta ahora, la existencia del *checkpoint* de abscisión citocinética relaciona el daño en el material genético con la citocinesis, aunque no establece la existencia de una posible DDR asociada ni cómo se llevaría a cabo. Sin embargo, ciertos trabajos pueden arrojar pistas sobre ello. Existen evidencias de interacciones de componentes de la DDR con los procesos de mitosis y citocinesis, que pueden clasificarse en varios grupos para su estudio.

#### a) Relaciones de componentes de la DDR con procesos de la división celular:

- ✓ Tal y como se describió en el apartado correspondiente a la DDR en mitosis, durante la mayor parte de la mitosis RNF8 se localiza en el *midbody*, donde regula salida mitótica (Tuttle *et al.*, 2007; Plans *et al.*, 2008).
- ✓ Se ha sugerido que MDC1 se une directamente a APC/C (Coster *et al.*, 2007) y regula la progresión mitótica por activación de APC mediada por CDC20 durante la transición de metafase a anafase (Townsend *et al.*, 2009).
- ✓ Un trabajo proponía que en mitosis 53BP1 se localiza en los cinetocoros de los cromosomas, colocalizando con la proteína centromérica CENP-E, desde donde podría intervenir en el control de la progresión mitótica a anafase (Jullien *et al.*, 2002).
- ✓ BRCA2 es reclutada al *midbody* por interacción con la Filamina A (una proteína de unión a actina). Allí, BRCA2 influye en el reclutamiento de proteínas asociadas al complejo ESCRT-III, como ALIX y TSG101, así como en la formación de complejos entre éstas y CEP55 durante la abscisión. Ciertas mutaciones asociadas a cáncer afectan a estas interacciones y provocan defectos en citocinesis, aunque no tengan efecto en la reparación por recombinación homóloga mediada por BRCA2, lo que asigna una nueva función clave a esta proteína (Mondal *et al.*, 2012).



- ✓ CHK1 está directamente regulada por fosforilación dependiente de CDK1 (Shiromizu *et al.*, 2006) y se requiere para varios aspectos de la división celular, como regulación del SAC (Zachos *et al.*, 2007), inhibición transcripcional de genes de Ciclinas y CDKs mitóticas (Krämer *et al.*, 2004), control de la segregación cromosómica (Peddibhotla *et al.*, 2009) y citocinesis (Peddibhotla *et al.*, 2009).

## **b) Relaciones de Aurora B con la DDR:**

- ✓ En relación con el último punto del apartado anterior, existen evidencias de que, a su vez, CHK1 podría activar a Aurora B en mitosis. Por una parte, se ha descrito que en mitosis podría desarrollarse cierta señal de *checkpoint* por CHK1, suficiente al menos para la activación de Aurora B en el SAC, que inhibiría así la transición de metafase a anafase a través de la fosforilación de BubR1. Esto se vería reforzado por la colocalización de CHK1 con BubR1 en los cinetocoros durante prometafase, así como por la generación de puentes anafásicos al deplecionar CHK1 (Zachos *et al.*, 2007).
- ✓ Otro estudio posterior concreta que CHK1 fosforila en mitosis a Aurora B en S<sup>331</sup> y que esta fosforilación se requiere para su activación completa y para el ensamblaje del CPC, no siendo sin embargo necesaria para la localización de Aurora B en los centrómeros, para su autofosforilación en T<sup>232</sup> o para su asociación con INCENP (Petsalaki *et al.*, 2011).
- ✓ A su vez, se ha descrito también que Aurora B activa a PLK1 en los centrómeros. El ensamblaje de los microtúbulos del huso mitótico a los cinetocoros es un proceso que en principio se lleva a cabo por interacciones aleatorias entre ambos. El balance entre uniones y corrección de errores (por liberación de microtúbulos unidos) requiere las actividades de las quinasas PLK1 y Aurora B, con PLK1 promoviendo uniones estables y Aurora B promoviendo desensamblajes. En *Drosophila*, INCENP del CPC también interacciona con PLK1 en los centrómeros, de forma que Aurora B la activa en mitosis temprana para que pueda ejercer esta función en los cinetocoros. Esta activación de PLK1 es distinta de la que tiene lugar en G2 tardío para entrada mitótica, que se produce en los centrosomas por Aurora A y su cofactor Bora (Carmena *et al.*, 2012).
- ✓ Finalmente, se ha descrito que, en mitosis, en ausencia de daño en el ADN, Aurora B activa a ATM por fosforilación en S<sup>1403</sup> y que esto es necesario para que ATM fosforile a la proteína del cinetocoro BUB1 en S<sup>314</sup> para el establecimiento del SAC. Además, ATM-S1403p colocaliza con Aurora B tanto en el huso central como en el *midbody* (Yang *et al.*, 2011).

**c) Relaciones de PLK1 con la DDR:**

- ✓ PLK1 y CHK2 interaccionan y colocalizan en el centrosoma en mitosis temprana y en el *midbody* en mitosis tardía (Tsvetkov *et al.*, 2003). Durante mitosis, PLK1 fosforila a CHK2, y esto impide su activación por fosforilación en T<sup>68</sup>, lo cual se hace por medio de la interacción de PLK1 con 53BP1 (van Vugt *et al.*, 2010).
- ✓ Ciertos estudios en *Xenopus laevis* relacionan a PLK1 (Plx1 en *Xenopus*) con la respuesta a estrés replicativo. En presencia de horquillas de replicación atascadas, la activación del *checkpoint* intra-S dependiente de ATM y ATR promueve la unión de PLK1 a los componentes unidos a la cromatina de la helicasa replicativa, el complejo MCM. Esto atenúa el efecto inhibitorio del *checkpoint* en los orígenes de replicación accesorios no disparados, que dejan de estar inhibidos y se activan. La activación de estos orígenes suplementarios soluciona las horquillas de replicación atascadas (Takaki *et al.*, 2008; Trenz *et al.*, 2008). Por otra parte, PLK1 actúa en la recuperación del *checkpoint* G2/M, en la que Claspin lo recluta para que suprima el efecto inhibitorio de entrada en mitosis que ejercía el *checkpoint* en presencia de ADN no replicado (Takaki *et al.*, 2008; Trenz *et al.*, 2008).
- ✓ Recientemente, un trabajo ha mostrado que el daño en el ADN y el estrés replicativo promueven la asociación de BRCA1 con PLK1, lo que reduce la actividad kinasa de esta última al interferir en sus interacciones con Aurora A y Bora (Zou *et al.*, 2013).
- ✓ Otro trabajo muestra que las endonucleasas de resolución de estructuras de Holliday, MUS81-EME1 (Mus81-Mms4 en *S. cerevisiae*) y GEN1 (Yen1 en *S. cerevisiae*), son activadas específicamente en mitosis. En concreto, PLK1 (Cdc5 en *S. cerevisiae*) activa en meiosis I y en mitosis a MUS81-EME1/Mus81-Mms4 por fosforilación de EME1/Mms4, e inhibe a GEN1/Yen1 hasta meiosis II (Matos *et al.*, 2011). Posteriormente, se ha demostrado cómo ciertas kinasas del ciclo celular coordinan la resolución de los intermediarios de recombinación con la segregación cromosómica (Matos *et al.*, 2013).
- ✓ Adicionalmente, estudios recientes indican que las roturas (“expresión”) de los sitios frágiles son un proceso fisiológico llevado a cabo de forma activa por las endonucleasas MUS81-EME1 y ERCC1-XPF durante mitosis, necesario para la correcta segregación de las cromátidas hermanas sin formación de puentes cromosómicos (Naim *et al.*, 2013; Ying *et al.*, 2013).

Con estos últimos datos, podemos hipotetizar que en mitosis existe una vía específica de reparación del daño en el ADN a través de las endonucleasas de resolución MUS81 y GEN1, que podrían estar actuando sobre los puentes cromosómicos que disparan el *checkpoint* de abscisión citocinética. Junto con los estudios anteriormente citados, podríamos pensar en una posible ruta en la que CHK1 activaría a Aurora B en mitosis, ésta a PLK1 y esta última a MUS81 y GEN1.



# OBJETIVOS





# OBJETIVOS

## 1) Estudio del mecanismo de reclutamiento de 53BP1 a las roturas de doble cadena del ADN:

- 1.1. Verificar la validez del *modelo clásico* de formación de focos de la proteína 53BP1.
- 1.2. Proponer un nuevo modelo de formación de focos de 53BP1, que logre explicar las inconsistencias del *modelo clásico*.
- 1.3. Asignar un posible papel general a los dominios de unión a cromatina en la respuesta al daño en el ADN.
- 1.4. Verificar nuestro nuevo modelo con la proteína 53BP1.
- 1.5. Extender el nuevo modelo a otras proteínas de la respuesta al daño en el ADN.
- 1.6. Elucidar nuevas relaciones entre la Epigenética y la respuesta al daño en el ADN.
- 1.7. Tratar de hallar la posible señal verdadera y la región de unión a ella en 53BP1 para el reclutamiento de ésta a las roturas de doble cadena del ADN.

## 2) Análisis de una posible respuesta al daño en el ADN asociada a citocinesis:

- 2.1. Identificar y caracterizar la respuesta al daño en el ADN asociada a citocinesis y al *checkpoint* de abscisión citocinética.
- 2.2. Explorar la participación de las proteínas 53BP1 y RPA como marcadores.
- 2.3. Evaluar los efectos del estrés replicativo.
- 2.4. Establecer su posible relación con el estado de condensación de la cromatina.
- 2.5. Estudiar la participación de las endonucleasas de resolución mitóticas.





# MATERIALES Y MÉTODOS





# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Estrategias de clonaje

### 1.1. Material de partida

La mayor parte de los clonajes efectuados se realizaron por PCR con *primers* específicos, diseñados mediante el software *DNA Club*<sup>®</sup>. Los clones de cDNA usados como molde se detallan en la Tabla 2. La delimitación de los elementos de 53BP1 clonados se estableció tal y como se indicó en el apartado de Introducción, mientras que la correspondiente a las restantes proteínas se efectuó obteniendo sus arquitecturas en dominios mediante análisis en la base de datos SMART (<http://smart.embl.de>). Los dominios proteicos subclonados se recogen en la Tabla 3.

Proteína	Gen (cDNA)	Especie	Clon IMAGE	Acceso GenBank	Procedencia
53BP1 / TP53BP1	<b>TP53BP1</b>	<i>Homo sapiens</i>	–	NM_005657	Lab. Inestabilidad Genómica, CNIO
MSH6 / GTBP / GTMBP	<b>Msh6</b> / <i>Gtmbp</i>	<i>Mus musculus</i>	IMAGE:4953238	BC051160	Unidad de Genómica, CNIO
DNMT3B1 / ADN MTasa HsaIIIB	<b>DNMT3B1</b>	<i>Homo sapiens</i>	–	NM_006892	Lab. Epigenética del Cáncer, CNIO
L3MBTL1	<b>L3MBTL1</b>	<i>Homo sapiens</i>	–	BC039820	Lab. Inestabilidad Genómica, CNIO
H1.2 / H1d / H1c	<b>HIST1H1C</b> / <i>H1F2</i>	<i>Homo sapiens</i>	IMAGE:3608862	BC002649	Unidad de Genómica, CNIO
HMGA1 / HMG-I / HMG-Y	<b>HMGA1</b>	<i>Homo sapiens</i>	IMAGE:5399570	BC063434	Unidad de Genómica, CNIO
POL $\lambda$ / POLL / ADN Polimerasa $\lambda$	<b>POLL</b>	<i>Homo sapiens</i>	IMAGE:3536366	BC003548	Unidad de Genómica, CNIO
EXO1 / HEX1 / hExo1	<b>EXO1</b>	<i>Homo sapiens</i>	IMAGE:2967734	BC007491	Unidad de Genómica, CNIO
RBM10 / GPATC9 / S1-1	<b>RBM10</b> / <i>GPATC9</i>	<i>Homo sapiens</i>	IMAGE:3845258	BC024153	Unidad de Genómica, CNIO

**Tabla 2 | Clones de cDNA usados para clonaje.** Se resalta en negrita el nombre más común de la proteína y del gen correspondiente. En los casos en los que se obtuvieron de una fuente externa, se muestra el número de clon de la colección de cDNAs del Consorcio IMAGE (*Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*).

Proteína	Acceso UniProtKB	Dominio	Residuos	Longitud (aas)
53BP1 humana	Q12888	Región IRIF	1220-1703	484
		Región HOD-SSDB	1211-1297	87
		Tudor en tándem	1480-1602	123
DNMT3B1 humana	Q9UBC3	PWWP	223-281	59
L3MBTL1 humana	Q9Y468	3xMBT-ZnF	206-581	376
H1.2 humana	P16403	H15	34-99	66
HMGAI humana	P17096	3xAT-Hook	23-93	71
POL $\alpha$ humana	Q9BTN8	HhH1	22-41	20
EXO1 humana	Q9UQ84	HhH2	212-245	34
RBM10 humana	Q5JRR2 / P98175	G-Patch	856-902	47
		RRM	301-380	80
Spastina humana	Q9UBP0	MIT	116-194	79

**Tabla 3 | Acotación de los dominios proteicos subclonados.** Se obtuvo mediante análisis de las secuencias de las proteínas en la base de datos SMART, a excepción de las regiones, que incluyen varios elementos seleccionados acorde con los requerimientos experimentales. El equivalente en la secuencia de ADN de las CDSs de los clones correspondientes se clonó por PCR y posteriormente se subclonó en el vector adecuado para obtener cada construcción génica. En el caso del dominio MIT, las construcciones se obtuvieron directamente por síntesis química.

## 1.2. Construcciones génicas etiquetadas con marcaje fluorescente

En el caso de las construcciones etiquetadas con GFP (proteína verde fluorescente, *green fluorescent protein*) o mRFP (proteína roja fluorescente monomérica, *monomeric red fluorescent protein*) en su extremo N<sub>1</sub>, se utilizó un sistema Gateway® con el vector direccional pENTR/D-TOPO (kit *pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit*, Invitrogen™) como plásmido entrada (*pENTRY*), y los vectores pcDNA 3.1 Dst 3.1 NT-GFP y pcDNA 3.1 Dst 3.1 NT-mRFP (Unidad de Microscopía Confocal, CNIO) como plásmidos destino (*pDEST*), llevándose a cabo entre ambos una recombinación *attL/R* mediada por Clonasa LR (Clonasa II, Invitrogen™). Los pasos de restricción y ligación de ADN se llevaron a cabo sobre productos de PCR clonados en el vector entrada. Las mutaciones puntuales se obtuvieron por mutagénesis sitio-dirigida (kit *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene™) sobre estos mismos clones.

La delección del dominio Tudor en tándem de 53BP1 se llevó a cabo por introducción mediante mutagénesis sitio-dirigida (cambios C4444G y A4923T en la CDS de 53BP1) de sendos sitios de restricción *PstI* flanqueando Tudor. En las construcciones de intercambio (*swapping*) de dominios, éstos se introdujeron por ligación, estando flanqueados por sitios *NsiI* (isoesquizómera de *PstI*, para evitar los efectos de los sitios internos *PstI*). Para la generación de la construcción IRIF  $\Delta$ Tudor se ligó un oligonucleótido conector (*linker*), previamente hidridado, que mantiene el marco de lectura. La generación de construcciones de adición de dominios se llevó a cabo de modo análogo, clonando los distintos elementos flanqueados por los sitios de restricción pertinentes, digiriendo por restricción y

ligando para subclonarlos junto a sus fusiones. En el diseño de los clonajes se enfatizó en el mantenimiento del marco de lectura (ORF) en las proteínas quiméricas, así como en la correcta colocación de la señal de terminación de la traducción (codón de *Stop*).

Los clones obtenidos se fueron verificando sucesivamente por análisis de restricción, secuenciación de ADN con *primers* de secuenciación específicos, y comparación de secuencias mediante la herramienta *BLAST2sequences* (del CNIO y del NCBI: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&SHOW\\_DEFAULTS=on&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)). Otras herramientas bioinformáticas usadas incluyen los paquetes *LaserGene*® 7.1 (DNASTAR™) y *VectorNTI Advance*® 10 (Invitrogen™).

### 1.3. Construcciones génicas etiquetadas para purificación de proteínas

Las proteínas destinadas a purificación para ensayos *in vitro* se etiquetaron en su extremo N<sub>t</sub> con el péptido GST (glutación S-transferasa). Para ello, se siguió la misma estrategia de clonaje mediante sistema *Gateway*® descrita anteriormente, pero usando como plásmido destino el vector pDEST15 (Invitrogen™), sistema de expresión en *E. coli* con promotor T7 inducible por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Para la obtención del mutante IRIF ΔHOD se partió de PCR del clon pMX-53DB ΔHOD (cedido por André Nussenzweig, *Laboratory of Genome Integrity, National Cancer Institute*, NIH, Bethesda, USA), que incluye esta delección en 53BP1.

### 1.4. Construcciones retrovirales de MSH6

Las construcciones basadas en *MSH6* se clonaron por PCR en el vector pCR-BluntII-TOPO (*Zero Blunt TOPO*® *PCR Cloning Kit*, Invitrogen™), subclonándose finalmente por restricción y ligación en el vector retroviral pBABE-hygro (Laboratorio de Inestabilidad Genómica, CNIO), escogido teniendo en cuenta que las células a infectar son resistentes a puomicina. En los *primers* para clonaje se incorporó la secuencia Kozak (GCC ACC previa al codón de inicio ATG), para facilitar la traducción de las proteínas.

### 1.5. Construcciones virales de endonucleasas mitóticas con dominio MIT

Las construcciones 3xFLAG-MIT-MUS81 y GEN1-MIT-3xFLAG se obtuvieron por síntesis química en fase sólida (servicio comercial *GeneArt*®, Invitrogen™). Para el diseño de las secuencias de nucleótidos se tomaron las CDSs de los ARNms humanos *MUS81* (acceso GenBank: NM\_025128) y *GEN1* (NM\_001130009). Se analizó la arquitectura en dominios de las proteínas MUS81 humana (acceso UniProtKB: Q96NY9) y GEN1 humana (Q17RS7) usando la base de datos SMART, para asignar la fusión de elementos, en cada caso, en el extremo con menor densidad de dominios. Se

empleó la CDS del ARNm de SPAST (Spastina) humano (NM\_014946) para obtener la secuencia codificante de su dominio MIT (Tabla 3). A la fusión se añadió la secuencia del antígeno 3xFLAG, que permite la detección de las proteínas quiméricas por inmunofluorescencia o por *Western blot*. Flanqueando al dominio MIT, se añadieron péptidos conectores (*linker*) de 3xGly bordeados por sitios de restricción *KpnI* y *SacI* por si fuera necesario extraer el dominio. Se incorporó además la secuencia Kozak (GCC ACC previa al codón de inicio ATG), para facilitar la traducción de las proteínas. En la construcción de GEN1 se eliminó el codón de fin de traducción (*Stop*) de esta proteína y se añadió (TGA) tras 3xFLAG. Finalmente, las construcciones se flanquearon por dos sitios múltiples de clonación (MCS, *multiple cloning site*), MCS-L (*PacI*–*BamHI*–*EcoRI*) y MCS-R (*PmeI*–*BamHI*–*XhoI*).

Tales construcciones génicas fueron proporcionadas por la casa comercial clonadas en vectores genéricos para su amplificación en bacterias (pMA-T-3xFLAG-MIT-MUS81 y pMK-RQ-GEN1-MIT-3xFLAG), de los cuales ambas se subclonaron en paralelo en los vectores pLVX-Puro (lentiviral) (Clontech™) y pBABE-puro (retroviral) (Laboratorio de Inestabilidad Genómica, CNIO), mediante digestión con *EcoRI*+*BamHI* y *BamHI*, respectivamente, y ligación.

## 2. Biología Celular

### 2.1. Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas celulares U2OS, 3T3, HeLa, A549 y MCF-7 se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, *Dulbecco's modified Eagle medium*) con 4.5 g/L glucosa y L-glutamina (Lonza™) con 10% de suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) (Lonza™) y antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco®, Invitrogen™), a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> atmosférico. La línea 293T, usada como células empaquetadoras para la producción de virus, se mantuvo en análogas condiciones pero siendo suplementada con FBS de distinto proveedor (Sigma™).

Los fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (iMEFs, *immortalized mouse embryonic fibroblasts*) 53BP1 KO fueron amablemente proporcionados por André Nussenzweig (*Laboratory of Genome Integrity, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA*). Se crecieron en medio DMEM (con 4.5 g/L glucosa y L-glutamina) (Lonza™) suplementado con 15% FBS (Lonza™) y antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco®, Invitrogen™), a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> atmosférico.

Los fibroblastos embrionarios de ratón primarios (PMEFs, *primary mouse embryonic fibroblasts*) se mantuvieron en medio DMEM sin piruvato (Lonza™) suplementado con 15% FBS (Lonza™) y antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco®, Invitrogen™), a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y en condiciones de hipoxia (3% O<sub>2</sub>). Los PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO (líneas E46.1, E70.2 y E70.6) y sus controles PMEFs wt (líneas E3.16, E69.1 y E69.2) fueron amablemente cedidos por Gunnar Schotta (*Munich Center for*

*Integrated Protein Science and Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Alemania).*

Las células ES (troncales embrionarias, *embryonic stem*) de ratón se mantuvieron en cultivo sobre gelatina (de piel porcina, tipo A) (Sigma-Aldrich™) al 0.1% en medio DMEM *Knock-Out* (Gibco®, Invitrogen™) suplementado con 15% FBS (Lonza™), antibióticos (penicilina/estreptomicina) (Gibco®, Invitrogen™), glutamina 2 mM (Gibco®, Invitrogen™), aminoácidos no esenciales (Lonza™),  $\beta$ -mercaptoetanol 100  $\mu$ M (Gibco®, Invitrogen™) y 100 U/mL de LIF (factor inhibidor de la leucemia) (10<sup>6</sup> U/mL ESGRO®, Millipore™). Fueron incubadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> atmosférico. Las células ES murinas *MSH6* KO y su control wt (línea RH3186) fueron amablemente suministradas por Hein te Riele (NKI, Amsterdam, Holanda), y las *Suv4-20h1,2* DKO (líneas B4-2 y B7-1♀) y su control wt (línea wt26) por Gunnar Schotta (*Munich Center for Integrated Protein Science and Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Alemania*).

## 2.2. Transfecciones transitorias

- **Lipofección convencional (directa):** Se llevó a cabo usando el reactivo Lipofectamina® 2000 (Invitrogen™) sobre células adheridas al sustrato, siguiendo las instrucciones del protocolo facilitado por el fabricante. La expresión se chequeó tras 48 h (pico de expresión).
- **Lipofección inversa:** También se usó el reactivo Lipofectamina® 2000 (Invitrogen™) según las instrucciones de su protocolo, pero sobre células libres en suspensión. Esta variante se empleó en las transfecciones de las células 293T productoras de virus.
- **Lipofección para MEFs:** Transfección con Lipofectamina® 2000 (Invitrogen™) útil para células primarias o derivadas de ellas (iMEFs), difíciles de transfectar, usada como alternativa a la nucleofección y la electroporación. La diferencia con el protocolo convencional radica en que se llevó a cabo sin suero. Antes de añadir a las células los complejos lipofectamina-ADN éstas se sometieron a dos lavados intensos con PBS (tampón fosfato salino, *phosphate-buffered saline*) a fin de eliminar toda traza de FBS. Seguidamente, se dejaron en OPTIMEM y se les añadieron los complejos lipofectamina-ADN. 4 h después, se cambió el medio y se sustituyó por el convencional. Se logró así una eficiencia de transfección en torno al 15-20%.
- **Nucleofección:** Este método también se usó para MEFs, difíciles de lipofectar. Se empleó el kit *MEF Nucleofector® Kit 1* (Lonza™), con el correspondiente nucleofector y sus cubetas de nucleofección. Se siguió el protocolo suministrado por el fabricante para este tipo celular.
- **Electroporación Neon:** Se realizó con el sistema *Neon® Transfection System* (Invitrogen™) siguiendo los protocolos e instrucciones del fabricante. Esta metodología de electroporación permite altos rendimientos de transfección y gran viabilidad celular para prácticamente

cualquier tipo celular, por lo que se usó como método predominante para PMEFs, iMEFs y células ES, difíciles de transfectar con las otras alternativas. Las condiciones de electroporación optimizadas empleadas figuran en la Tabla 4. Los experimentos se diseñaron teniendo en cuenta que el pico de expresión se alcanza a las 24 h post-transfección.

Tipo celular	Voltaje del pulso (V)	Amplitud del pulso (ms)	Número de pulsos	Eficiencia de transfección	Viabilidad celular
iMEFs 53BP1 KO	1400	20	2	≈73%	≈95%
PMEFs	1650	20	1	≈90%	≈95%
Células ES murinas	1400	10	3	≈71%	≈90%

**Tabla 4 | Condiciones de electroporación Neon para los distintos tipos celulares empleados.** Para los iMEFs se llevó a cabo un protocolo de optimización. Para PMEFs y células ES murinas se usaron las condiciones proporcionadas por el fabricante. La eficiencia de transfección y la viabilidad celular aproximadas se hallaron por citometría de flujo en electroporaciones de plásmidos con GFP.

### 2.3. Infecciones virales y generación de líneas celulares

- Infecciones retrovirales de células murinas:** Para la producción de retrovirus no replicativos se cotransfectaron mediante lipofección inversa con Lipofectamina® 2000 (Invitrogen™) los vectores retrovirales (pBABE-hygro, pBABE-hygro–MSH6 wt y pBABE-hygro–MSH6 PWCA, 10 µg de cada) con el plásmido de envuelta ecotrópica (pCL-Eco, incluye la retrotranscriptasa, 5 µg), en proporción 2:1, en células empaquetadoras 293T ( $6 \cdot 10^6$  células/P100). A partir de éstas se generó sobrenadante viral durante 48 h post-transfección. Seguidamente, se filtraron por un filtro de 0.45 µm y se suplementaron con 8 µg/mL de polibreno, para incubarse con células ES *MSH6* KO de ratón sembradas en P100 a aproximadamente el 60% de confluencia, durante 8 h de infección. 48 h después de ésta, las células infectadas se sometieron a selección con higromicina B (Calbiochem®, Merck-Millipore™) a concentración 200 µg/mL.
- Infecciones retrovirales de células humanas:** Se realizaron de forma análoga a la anteriormente descrita. Se cotransfectaron los vectores retrovirales (pBABE-puro, pBABE-puro–3xFLAG–MIT–MUS81 y pBABE-puro–GEN1–MIT–3xFLAG, 10 µg de cada) con el plásmido de envuelta anfotrópica (pCL-Ampho, 5 µg) y con el plásmido con la retrotranscriptasa (pGAG–POL, 5 µg), en proporción 2:1:1. Paralelamente, se usó otro sistema de infección con el plásmido de envuelta politrópica (pVSV-G) y el de la retrotranscriptasa (pGAG–POL), también en proporción 2:1:1. Se infectaron células U2OS sembradas en P6 al 60–70% de confluencia. La selección se llevó a cabo con puromicina (Sigma-Aldrich™) a 2 µg/mL durante otras 48 h, si bien las líneas obtenidas se siguieron manteniendo con el antibiótico.
- Infecciones lentivirales de células humanas:** Se siguió el mismo protocolo. Se cotransfectaron los vectores lentivirales (pLVX-Puro, pLVX-Puro–3xFLAG–MIT–MUS81 y pLVX-

Puro–GEN1–MIT–3xFLAG, 10 µg de cada) con el plásmido de envuelta politrópica (pVSV-G, 5 µg) y el de la retrotranscriptasa (pΔ9.8, incluye los elementos GAG–POL–TAT–REV, 7.5 µg), en proporción 2:1:1.5. La infección de células U2OS y su selección y mantenimiento se llevaron a cabo como en el caso anterior.

## 2.4. Interferencia de ARN (RNAi)

Para los experimentos con interferencia de ARN (RNAi, *RNA interference*) se obtuvieron diversos oligonucleótidos de siRNAs (ARNs pequeños interferentes, *small interfering RNAs*) contra distintas proteínas, los cuales se recopilan en la Tabla 5. Los siRNAs se resuspendieron a concentración de 20 µM siguiendo las instrucciones del proveedor. Las transfecciones se realizaron sobre células a un 30-50% de confluencia (U2OS/3T3 sembradas el día anterior a densidad de 150.000 células por pocillo de P6, o el doble para una P60) usando como reactivo de transfección Lipofectamina® RNAiMAX (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfectaron 2 µL de siRNA a 20 µM por pocillo de P6 con 3 mL de medio (el doble para una P60), quedando a una concentración final efectiva de 13.33 nM. Los experimentos se comenzaron 48 h después de la transfección, efectuándose los análisis a los 3-4 días tras ésta (los *knock-downs* son efectivos a partir de las 24-48 h, y duran hasta unos 7 días). En función del método más eficaz, se evaluó la eficiencia de cada siRNA mediante *Western blot* o qRT-PCR.

Nombre siRNA	Secuencia ARN (sentido)	Tipo	Proveedor
siBLM_human	5'-GCU AGG AGU CUG CGU GCG ATT-3'	Dúplex de siRNA Stealth RNAi®	Invitrogen™
siMMS21_human	5'- GGA GUU GAC GAA GAU AUG ATT -3'		
siBRCA1_human	5'-GUG UGC AGC UGA GAG GCA TT-3'		
siBLM_mouse	5'-UCA UAC GAA GGA AAC UCA CGU CAA U-3'		
siMMS21_mouse	5'-GGA UAA GAA CUC UGA UGC CGA CUU U-3'		
siBRCA1_mouse	5'-CCG AUG UUC CUU GGA UAA CAC UAA A-3'		
siCTRL Stealth	<i>Stealth® Scramble Control siRNA</i>		
siMUS81_human	5'-UGA CCC ACA CGG UGC GCA A-3'	siRNA ON-TARGETplus®	Dharmacon®, Thermo Scientific™
siGEN1_human	5'-GCC CUA AGA UAC AUA UUA A-3'		
siSLX4_human	5'-GCG GAG ACU UUG UUG AAA U-3'		
siCTRL ON-TARGETplus	<i>ON-TARGETplus® Non-targeting siRNA #1</i>		
siCtIP_human	5'-UCC ACA ACA UAA UCC UAA U dTdT-3'	siRNA Silencer® Select	Ambion®, Invitrogen™
siSMC2_human	5'-CUA UCA CUC UGG AAC UGG A dTdT-3'		
siCTRL Silencer Select	<i>Silencer® Negative Control siRNA #1</i>		

**Tabla 5 | Oligonucleótidos de siRNA usados para RNAi.** El nombre indica cuál es la proteína diana en cada caso. Los siRNAs control se indican con las siglas "CTRL". Se muestran las secuencias sentido (los nucleótidos dT son protuberantes), excepto en el caso de los controles (no proporcionadas por las casas comerciales). Para cada tipo de siRNA se usó su control correspondiente.



## 2.5. Sincronización celular

### ▪ Sincronización celular para inhibición anafásica:

Este protocolo permite detener las células en anafase, lo cual se usó para aplicar en este punto ciertos tratamientos farmacológicos. Fue desarrollado por Petronczki *et al.*, 2007. El rendimiento de la sincronización no siempre resulta óptimo, pero las células se mantienen en todo momento adheridas al sustrato. Por ello, resulta apropiado para analizar puentes de 53BP1-RPA, aplicación para la que se detalla el procedimiento.

Se sembraron 25.000-35.000 células U2OS por pocillo de placa *multiwell* P24 sobre cristales de inmunofluorescencia previamente esterilizados al UV y tratados con gelatina (de piel porcina, tipo A) (Sigma-Aldrich™) al 0.1%. Tras 36 h, se añadió timidina 2.5 mM fresca y se incubó durante 24 h a 37 °C para detener las células en fase S. A continuación, se eliminó el medio con timidina, se aplicaron dos lavados con PBS y se añadió nuevo medio, incubando 6 h a 37 °C. Seguidamente, se añadió nocodazol a 250 ng/mL y se incubó durante 4 h a 37 °C, para detener las células en prometafase. Finalmente, se añadió MG132 10 µM durante 2 h a 37 °C. Se eliminó el medio, se aplicaron dos lavados con PBS y se añadió nuevo medio, incubando durante 20 min a 37 °C, lo que permite que las células progresen hacia anafase. En este punto, se aplicaron distintos tratamientos farmacológicos destinados a la inhibición de proteínas en anafase. Se incubó a 37 °C durante 10 h, a fin de analizar los resultados por tinción inmunofluorescente antes del término de la siguiente fase G1.

### ▪ Sincronización celular por “shake-off” mitótico:

Este otro protocolo permite detener las células en metafase-anafase para aplicar tratamientos farmacológicos. Se consigue un buen rendimiento de sincronización, pero las células se despegan del sustrato y se arrastran ciertos restos celulares. Por ello, no resulta apropiado para el análisis de puentes de 53BP1-RPA, pero sí es óptimo para el estudio de *midbodies* y binucleación, caso que consideramos.

El procedimiento se basa en que las células adherentes en fase mitótica (aproximadamente el 5-10% en un cultivo asíncromo) se despegan del sustrato quedando débilmente unidas por un pedúnculo, por lo que pueden liberarse por agitación mecánica (“shake-off”) y recogerse. Se crecieron células U2OS en varios frascos T162 hasta subconfluencia (≈90%) y se les aplicó el “shake-off” agitando y golpeando moderadamente el frasco así como aplicando lavados con el medio caliente. Se transfirió el medio conteniendo las células mitóticas a un tubo estéril, que se almacenó en hielo. Se añadió nuevo medio al frasco y se devolvió al incubador. Para obtener suficientes células mitóticas, se realizaron sucesivas rondas de “shake-off” repitiendo estos pasos cada 10-20 min durante 1.5-2 h. Finalmente, se concentraron las células por centrifugación en centrífuga de mesa a 1.400 rpm durante 5 min y se resuspendieron en un volumen común (3-5 mL), para aplicar recuento celular. Para los experimentos, se sembraron 60.000-80.000 células mitóticas en cada pocillo de P24 sobre cristales de



inmunofluorescencia estériles tratados con poli-D-lisina (*BD BioCoat®*, BD Biosciences™) para acelerar la adhesión celular. Se incubaron durante 20 min a 37 °C, a fin de promover la transición de metafase a anafase. En este punto, se aplicaron distintos tratamientos farmacológicos destinados a la inhibición de proteínas en anafase. Se incubó a 37 °C durante 10 h, a fin de analizar los resultados por tinción inmunofluorescente antes del término de la siguiente fase G1.

## 2.6. Tratamientos farmacológicos

En el desarrollo de estos estudios se utilizaron tratamientos farmacológicos con diversas drogas, las cuales se recopilan en la Tabla 6.

Droga	Efectos	Stock	Uso	Procedencia
<b>DMSO</b> (Dimetilsulfóxido)	Control (solvente)	Puro	Dilución	Sigma-Aldrich™
<b>Timidina</b> (Desoxitimidina)	Inhibidor de la síntesis de ADN (a altas concentraciones). Bloqueo en fase S.	250 mM	2.5 mM (24 h)	Sigma-Aldrich™
<b>Nocodazol</b>	Inhibidor de la polimerización de microtúbulos. Bloqueo en prometafase.	250 µg/mL	250 ng/mL (6 h)	Sigma-Aldrich™
<b>MG132</b>	Inhibidor del Proteasoma 26S.	3 mM	10 µM (2h)	Sigma-Aldrich™
<b>Cisplatino</b> ( <i>cis</i> -Pt) <small>[<i>cis</i>-diaminodichloroplatino (II)]</small>	Entrecruzamientos intra- e intercatenarios en el ADN. Inducción de apoptosis.	33 mM	Células ES: 20-40 µM PMEFs: 50-100 µM (18 h)	Sigma-Aldrich™
<b>Cafeína</b>	Inhibidor de PIKKs. Inhibidor genérico de la DDR.	100 mM	5 mM (o/n - 24 h)	Sigma-Aldrich™
<b>APH</b> (Afidicolina)	Inhibidor de las ADN Polimerasas A y D. Bloqueo en fase S temprana. Inducción de estrés replicativo.	5 mM	0.2-0.8 µM (24-72 h)	Sigma-Aldrich™
<b>UCN01</b>	Inhibidor de CHK1 ( <b>CHK1i</b> ).	300 µM	300 nM (8-24 h)	Sigma-Aldrich™
<b>KU-55933</b>	Inhibidor de ATM ( <b>ATMi</b> ).	10 mM	10 µM (o/n - 24 h)	André Nussenzweig (NIH, Bethesda)
<b>ETP464</b> ( <b>ATRi 464</b> )	Inhibidor de ATR ( <b>ATRi</b> ).	5 mM	5 µM (o/n - 24 h)	Programa de Terapias Experimentales, CNIO
<b>AZD2281</b> ( <b>Olaparib</b> )	Inhibidor de PARP4 ( <b>PARPi</b> ). Daño en el ADN y defectos en segregación cromosómica.	1 mM	1 µM (o/n - 24 h)	AstraZeneca™
<b>ICRF-193</b>	Inhibidor catalítico de TOPO-IIα/β ( <b>TOPO-IIi</b> ). Induce DSBs en el ADN.	10 mM	5 µM (24-48 h)	Sigma-Aldrich™
<b>Dexrazoxano</b>	Inhibidor catalítico de TOPO-IIα/β ( <b>TOPO-IIi</b> ). Induce DSBs en el ADN. Más potente que ICRF-193.	100 mM	100 µM (o/n)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
<b>ZM1</b>	Inhibidor de Aurora B ( <b>AURKBi</b> ).	10 mM	2 µM (10-24 h)	Grupo de División Celular y Cáncer, CNIO
<b>BI 2536</b>	Inhibidor de PLK1 ( <b>PLK1i</b> ).	200 µM	100 nM (10-24 h)	Grupo de División Celular y Cáncer, CNIO

**Tabla 6 | Drogas usadas en los tratamientos farmacológicos.** Se indican las condiciones de utilización experimental.

### 3. Tinciones inmunofluorescentes

#### 3.1. Inmunofluorescencia convencional (“Protocolo de Thomas Jenuwein”)

La inmunofluorescencia convencional se llevó a cabo en células sembradas en pocillos de placas *multiwell* P24 sobre cubreobjetos circulares esterilizados al UV y tratados con gelatina (Sigma-Aldrich™) al 0.1%. Lavando primero con PBS, se realizó fijación con paraformaldehído (PFA) al 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados de 10 min con PBS y se permeabilizaron las células con solución de permeabilización (0.1% citrato sódico + 0,1% Tritón X-100 en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 5 min a temperatura ambiente. A esto siguieron 2 lavados de 5 min con PBS y otros 2 de 5 min con solución de lavado (0.25% BSA + 0.1% Tween20 en PBS). Se bloquearon los cristales 30 min en solución de bloqueo (2.5% BSA + 0.1% Tween20 + 10% suero de cabra en PBS). La incubación con los anticuerpos primarios se efectuó en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con 30 min adicionales a temperatura ambiente (en función del anticuerpo). Tras 3 lavados de 10 min con solución de lavado, se incubó con los anticuerpos secundarios (conjugados a fluoróforos) en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 h en oscuridad. Éstos se eliminaron por 2 lavados de 10 min con solución de lavado. Finalmente, se tiñó el ADN con solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma-Aldrich™) en *buffer* SSC 2x durante 1 min en oscuridad y se lavó 3 veces con PBS durante 5 min. Por último, las preparaciones fueron fijadas en medio de montaje Mowiol® 4-88 (Calbiochem®, Merck-Millipore™) sobre portaobjetos.

#### 3.2. Inmunofluorescencia con pre-extracción

Este protocolo se empleó para optimizar la visualización de aquellas proteínas que se encuentran en estructuras asociadas a la cromatina, ya que se pre-extraen de la célula las que son lábiles, tanto citosólicas como nucleares.

Tras 2 lavados en PBS sobre hielo, el paso de extracción se llevó a cabo por incubación en *buffer* CSK-I (de pre-extracción) (10 mM PIPES pH 6.8 + 100 mM NaCl + 300 mM sacarosa + 3 mM MgCl<sub>2</sub> + 1 mM EGTA + 0.5% Tritón X-100 en H<sub>2</sub>O Milli-Q) frío (mantenido en hielo) durante 3-8 min (dependiendo del tipo celular y de la tinción inmunofluorescente) sobre hielo. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS frío (mantenido en hielo) sobre hielo. Seguidamente, se procedió a la fijación con *buffer* mSTF (STF modificado, de fijación) (150 mM BNP (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol, bronopol) + 108 mM diazolidinil-urea + 10 mM citrato sódico + 50 mM EDTA pH 5.7 en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 30 min a temperatura ambiente. Siguieron 2 nuevos lavados de 5 min con PBS frío sobre hielo. Tras ello, la permeabilización se efectuó con *buffer* PB (de permeabilización) (100 mM Tris-HCl pH 7.4 + 50 mM EDTA pH 8.0 + 0.5% Tritón X-100 en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 2 lavados de 5 min con PBS a temperatura ambiente.

A partir de aquí, se realizaron los pasos de bloqueo, incubación con anticuerpos primarios, lavados, incubación con anticuerpos secundarios, lavados, tinción con DAPI, lavados y montaje de la misma forma que en la inmunofluorescencia convencional.

### 3.3. Tinción inmunofluorescente de puentes de 53BP1-RPA (53RBs)

Para la visualización óptima de estas estructuras se llevó a cabo una tinción inmunofluorescente con pre-extracción aplicando ciertas modificaciones y peculiaridades. Las células (U2OS, principalmente) se sembraron a una densidad de 30.000 células por pocillo de P24 y se mantuvieron en crecimiento adheridas al sustrato durante un mínimo de 48 h (el equivalente a 1-2 ciclos celulares). Tras ello, la pre-extracción se realizó con *buffer* CSK-I frío durante 7 min en hielo. La fijación se llevó a cabo con metanol frío (mantenido a -20 °C) durante 1 h a -20 °C. La permeabilización, con *buffer* PB según el modo indicado. Como anticuerpos primarios se usaron anti-53BP1 (dilución 1:1000, conejo, Novus Biologicals™) y anti-RPA32 (dilución 1:200, rata, Cell Signaling Technology™), incubándose durante toda la noche a 4 °C y 30 min adicionales a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se emplearon anti-IgG<sup>Conejo</sup>-AlexaFluor488 (verde, dilución 1:200, pollo, Molecular Probes®, Invitrogen™) y anti-IgG<sup>Rata</sup>-AlexaFluor594 (rojo, dilución 1:200, pollo, Molecular Probes®, Invitrogen™), respectivamente, incubándose 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.

### 3.4. Inmunofluorescencia de proteínas cinetocóricas

Este protocolo de inmunofluorescencia se aplicó para proteínas asociadas a los cinetocoros o a los centrómeros que resultan difícilmente detectables con los protocolos anteriores, como es el caso de las helicasas PICH y BLM.

Después de un lavado inicial con PBS, la fijación y la permeabilización se efectuaron conjuntamente con el *buffer* PTEMF (20 mM PIPES pH 6.8 + 0.2% Tritón X-100 + 10 mM EGTA + 1 mM MgCl<sub>2</sub> + 4% paraformaldehído en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 10 min a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 10 min con PBS, se procedió al bloqueo con solución de bloqueo (3% BSA en PBS) durante 30 min. Seguidamente, se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Se eliminaron con 3 lavados de 10 min con PBS-T (0.2% Tween20 en PBS), tras lo cual se incubó con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-T más un lavado adicional de 10 min con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Por último, se tiñó con DAPI (solución en *buffer* SSC 2x) durante 1 min en oscuridad y se lavó 3 veces con PBS durante 5 min, para efectuar el montaje con Mowiol® 4-88 sobre portaobjetos.

### 3.5. Inmunofluorescencia de alto rendimiento (HTM)

A fin de realizar análisis por microscopía de alto rendimiento (HTM, *high-throughput microscopy*), las células se cultivaron en placas *multiwell* de 96 pocillos (P96) con fondo plano de cristal  $\mu$ Clear® (Greiner Bio-One™). Se usó el protocolo de inmunofluorescencia convencional, salvo que tras la tinción con DAPI las preparaciones se dejaron en PBS en lugar de medio de montaje.

### 3.6. Inmuno-cenFISH

El protocolo de inmuno-cenFISH consiste en la combinación de un FISH (hibridación fluorescente *in situ*, *fluorescent in situ hybridization*) centromérico (cenFISH) con posterior tinción inmunofluorescente de proteínas. Es útil para detectar elementos centroméricos (u otros cualesquiera, cambiando la sonda) a nivel de secuencia de ADN y analizar su localización con respecto a las proteínas de interés.

#### a) FISH centromérico (cenFISH):

Se partió de células sembradas en pocillos de placas *multiwell* P24 sobre cubreobjetos circulares esterilizados al UV y tratados con gelatina (Sigma-Aldrich™) al 0.1%. La primera parte del protocolo es el cenFISH. Tras un primer lavado con PBS, se procedió a la fijación con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se aplicaron 3 lavados de 5 min en PBS. Seguidamente, se procedió a la deshidratación de las muestras por incubaciones sucesivas en etanol 70%, 90% y 100% durante 5 min cada una y a temperatura ambiente. Tras ello, se secaron los cristales al aire colocados sobre papel de filtro. Durante este tiempo, se preparó la mezcla de la sonda: 10 mM Tris pH 7.2-7.5 + 8.56% V/V *buffer* MgCl<sub>2</sub> (25 mM MgCl<sub>2</sub> + 9 mM ácido cítrico + 82 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7) + 70% formamida desionizada + 0.25% BR (reactivo de bloqueo, *blocking reagent*) (cedido por el Grupo de Telómeros y Telomerasa, CNIO) + 0.5 µg/mL de sonda CENP-B–AF488 PNA en H<sub>2</sub>O BM (grado Biología Molecular). Seguidamente, los cubreobjetos suficientemente secos se colocaron sobre gotas de 40 µL de mezcla de la sonda en un portaobjetos. Para el paso de desnaturalización del ADN y de la sonda, el montaje se incubó durante 3 min a 80 °C en un horno de hibridación para portaobjetos (*Slide Moat*®, Boekel™). Posteriormente, la incubación con la sonda se llevó a cabo colocando el montaje en una cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, se retiraron los cubreobjetos con las muestras y se lavaron 2 veces en solución de lavado (70% formamida + 10 mM Tris pH 7.2-7.5 + 0.1% BSA en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 15 min con agitación extensa. A esto siguieron otros 3 lavados de 5 min con TBS-T (0.08% Tween20 en TBS). En este punto, es posible aplicar tinción con DAPI y montaje sobre cubreobjetos para microscopía.

La sonda usada, denominada CENP-B–AF488 PNA, fue amablemente proporcionada por el Grupo de Telómeros y Telomerasa, CNIO. Se trata de un PNA (ácido peptidonucleico, *peptide*

*nucleic acid*) que incluye la secuencia de ADN de la cadena conductora (*leading*) de la caja *CENP-B* (*CENP-B box*), que es una secuencia repetitiva de 17 pb presente en el satélite- $\alpha$  tipo-I centromérico de humano y en el satélite menor centromérico de ratón, a la cual se une la proteína *CENP-B*. Por tanto, la sonda reconoce centrómeros tanto humanos como murinos. Se halla conjugada con el fluoróforo AlexaFluor488, que emite su señal en el color verde (488 nm). Su secuencia completa es: 5'N<sub>t</sub>-AlexaFluor488-OO-ATTCGTTGGAAACGGGA-Lys-C<sub>t</sub>3' (el grupo -OO- actúa como *linker*).

## b) Tinción inmunofluorescente:

La segunda parte del protocolo consiste en la tinción inmunofluorescente de proteínas. Se comenzó con un lavado en PBS de 10 min. Seguidamente, se llevó a cabo una permeabilización mediante 3 incubaciones de 15 min con PBS 0.5% Tritón X-100. Tras un lavado de 10 min en PBS, se procedió al bloqueo con solución de bloqueo (2.5% BSA + 0.1% Tween20 + 10% suero de cabra en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C más 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se aplicaron 3 lavados de 5 min con PBS 0.5% Tritón X-100. La incubación con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo se llevó a cabo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras ello, se aplicaron 5 lavados de 5 min con PBS 0.1% Tritón X-100. Se tiñó con DAPI (solución en *buffer* SSC 2x) durante 5 min en oscuridad, se lavó con PBS durante 10 min y se efectuó el montaje de las muestras con Mowiol® 4-88 sobre portaobjetos.

## 3.7. Tinción fluorescente de citoplasma y núcleo

Las células sembradas sobre cubreobjetos en placas P24 fueron lavadas con PBS previamente a su fijación con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Tras 2 lavados de 10 min con PBS, se permeabilizaron con solución de permeabilización (0.1% citrato sódico + 0,1% Tritón X-100 en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron 2 nuevos lavados de 5 min con PBS. A continuación, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad con una solución en SSC 2x de DAPI (tinción de ADN) junto al colorante HCS CellMask™ Deep Red (Molecular Probes®, Invitrogen™), que tiñe citoplasmas y núcleos y posee un fluoróforo que emite en el rojo lejano (647 nm). Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se montaron los cristales con Mowiol® 4-88 sobre portaobjetos. De este modo, todo el contenido celular aparece teñido en rojo lejano, delimitándose los núcleos en azul.

## 3.8. Tinción de ssDNA por etiquetado nativo con BrdU

Se trata de un etiquetado con BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), nucleósido sintético análogo a la T, que se incorpora en lugar de ésta al ADN de nueva síntesis. El procedimiento se lleva a cabo de

forma análoga a la utilización del BrdU en estudios de proliferación celular, con la salvedad de que en este caso el tratamiento transcurre sin el paso de desnaturalización del ADN bicatenario, por lo que el BrdU sólo es accesible para su reconocimiento por el anticuerpo anti-BrdU en las regiones de ADN monocatenario (ssDNA), que son detectadas mediante este procedimiento.

Previamente, las células en cultivo sobre cristales de microscopía en placas P24 fueron incubadas con BrdU (Sigma-Aldrich™) a concentración final de 10  $\mu$ M durante 48 h. Tras un lavado con PBS, se procedió a su fijación con metanol frío (mantenido a -20 °C) durante 1 h a -20 °C. Seguidamente, se efectuaron 2 lavados de 10 min con PBS a temperatura ambiente y se bloqueó con solución de bloqueo (5% BSA en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. A partir de este punto, los pasos de incubación con anticuerpos primarios, lavados, incubación con anticuerpos secundarios, lavados, tinción con DAPI, lavados y montaje se realizaron de la misma forma que en la inmunofluorescencia convencional, pero diluyendo los anticuerpos en la solución de bloqueo anteriormente descrita (5% BSA en PBS). Para la detección de BrdU se usó como anticuerpo primario anti-BrdU (dilución 1:100, ratón, *GE Healthcare Cell Proliferation kit*®, GE Healthcare Life Sciences™).

### 3.9. Etiquetado con EdU para HTM

Este procedimiento usa el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), análogo sintético de la T, que se incorpora en la síntesis de ADN. La señal del EdU permite analizar la proliferación celular en cultivo.

Como punto de partida, se sembraron 8.000-12.000 células U2OS por pocillo en una placa *multiwell* de 96 pocillos (P96) con fondo plano de cristal  *$\mu$ Clear*® (Greiner Bio-One™). Se incubó con EdU (Invitrogen™) a concentración final de 20  $\mu$ M durante 45 min a 37 °C. Tras un lavado con PBS, se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente. Siguió dos lavados de 10 min con solución de lavado (0.25% BSA + 0.1% Tween20 en PBS). A continuación, las células se permeabilizaron con solución de permeabilización (0.5% Tritón X-100 en PBS) durante 20 min a temperatura ambiente. Tras ello, se realizaron de nuevo 2 lavados de 5 min con solución de lavado. El siguiente paso fue la reacción *Click-iT*, por la cual una azida conjugada con un fluoróforo se incorpora, mediante catálisis con  $\text{CuSO}_4$ , al EdU, permitiendo que éste sea posteriormente detectado por fluorescencia. Se preparó la mezcla de reacción *Click-iT* (para 3 mL: 60  $\mu$ L  $\text{CuSO}_4$  + 15  $\mu$ L Azida-AlexaFluor488 + 300  $\mu$ L Aditivo *Buffer* de Reacción + 2.625 mL PBS estéril) con componentes del kit comercial *Click-iT® EdU AlexaFluor®488 Flow Cytometry Assay Kit* (Invitrogen™), se añadieron 40  $\mu$ L por pocillo y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en oscuridad. Seguidamente, se aplicaron 2 lavados de 5 min con solución de lavado. Se tiñó con DAPI (solución en SSC 2x) durante 2 min en oscuridad y se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS. Las muestras se almacenaron en PBS a 4 °C hasta su análisis por microscopía HTM (de alto rendimiento, *high-throughput microscopy*), donde la señal de EdU se detectó en verde (488 nm) y se cuantificó como intensidad de EdU por núcleo.

### 3.10. Anticuerpos primarios usados para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Origen	Especificidad	Dilución	Proveedor
ACA	Humano	Humano, Ratón	1:500	Grupo de Dinámica Cromosómica, CNIO
anti-53BP1	Conejo	Humano, Ratón	1:1.000	Novus Biologicals™
anti-AURKB	Conejo	Humano, Ratón, Rata, Hámster	1:200	Abcam™
anti-AURKB	Ratón	Humano, Ratón, Rata	1:200	BD Transduction Laboratories™
anti-BLM	Conejo	Humano	1:200	Ian Hickson, Københavns Universitet
anti-BLM	Conejo	Ratón	1:400	Ian Hickson, Københavns Universitet
anti-BRCA1	Ratón	Humano	1:200	Calbiochem™
anti-BRCA1	Ratón	Ratón	1:1.000	Unidad de Anticuerpos Monoclonales, CNIO
anti-BrdU	Ratón	BrdU	1:100	GE Healthcare Life Sciences™
anti-CHK1-S345P	Conejo	Humano, Ratón, Rata, Mono	1:200	Cell Signaling Technology™
anti-CHK2-T68P	Conejo	Humano, Ratón, Mono	1:200	Cell Signaling Technology™
anti-FANCD2	Conejo	Humano, Ratón, Rata	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-FANCD2	Ratón	Humano	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-FANCM	Conejo	Humano	1:200	FARF (Fanconi Anemia Research Foundation)
anti-FANCM	Conejo	Ratón	1:200	FARF (Fanconi Anemia Research Foundation)
anti-FLAG	Ratón	Epítipo FLAG	1:2.000	Agilent Technologies™
anti-GEN1	Conejo	Humano, Ratón	1:500	Abcam™
anti-γH2AX	Ratón	Todos	1:1.000	Upstate™
anti-KAP1-S473P	Conejo	Humano	1:200	BioLegend™
anti-KAP1-S824P	Conejo	Ratón	1:200	Bethyl Laboratories, Inc.
anti-MMS21	Conejo	Ratón	1:500	Unidad de Anticuerpos Monoclonales, CNIO
anti-MMS21	Ratón	Humano	1:200	Unidad de Anticuerpos Monoclonales, CNIO
anti-MUS81	Ratón	Humano, Ratón	1:1000	Abcam™
anti-PCNA	Ratón	Humano, Ratón, Rata, Levadura	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-PICH	Rata	Humano, Ratón	1:5.000	Erich Nigg, Biozentrum, University of Basel
anti-PICH	Ratón	Humano	1:150	Ian Hickson, Københavns Universitet
anti-RAD51	Conejo	Humano, Ratón, Rata	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-RPA32	Rata	Humano, Ratón, Rata, Mono, Hámster	1:200	Cell Signaling Technology™
anti-SMC1-P	Conejo	Humano, Ratón	1:300	Unidad de Anticuerpos Monoclonales, CNIO
anti-SMC2	Conejo	Humano	1:100	Grupo de Dinámica Cromosómica, CNIO
anti-TPX2	Conejo	Humano, Ratón	1:500	LifeSpan Biosciences, Inc.
anti-α-Tubulina	Ratón	Todos	1:500	Sigma™

**Tabla 7 |** Listado de anticuerpos primarios usados para inmunofluorescencia.

### 3.11. Anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Origen	Especificidad	Color	Dilución	Proveedor
anti-IgG <sup>Conejo</sup> –AlexaFluor488	Pollo	Conejo	Verde	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Conejo</sup> –AlexaFluor594	Pollo	Conejo	Rojo	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Conejo</sup> –AlexaFluor647	Pollo	Conejo	Rojo lejano	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Humano</sup> –FITC	Burro	Humano	Verde	1:200	G. Dinámica Cromosómica, CNIO
anti-IgG <sup>Rata</sup> –AlexaFluor488	Pollo	Rata	Verde	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Rata</sup> –AlexaFluor594	Pollo	Rata	Rojo	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Ratón</sup> –AlexaFluor488	Cabra	Ratón	Verde	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Ratón</sup> –AlexaFluor594	Cabra	Ratón	Rojo	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™
anti-IgG <sup>Ratón</sup> –AlexaFluor647	Pollo	Ratón	Rojo lejano	1:200	Molecular Probes®, Invitrogen™

**Tabla 8 |** Listado de anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia.



## 4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

### 4.1. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

Las proteínas destinadas a ensayos *in vitro* fueron expresadas como fusiones a GST (glutathión S-transferasa) en bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3) desde el vector de expresión pDEST15 (Invitrogen™). La proteína GST libre se expresó desde el vector pGEX-5X-3. Las bacterias se transformaron con estos plásmidos por electroporación y se sembraron en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich™) (100 µg/mL), creciéndose a 37 °C durante toda la noche. Se picó una colonia de tamaño medio y se creció en un precultivo de 25 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche a 37 °C en agitación. Tras ello, se tomaron 10 mL de precultivo y se llevaron a 500 mL (dilución 1:50) de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Este cultivo se creció a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6-0.8 U (fase exponencial de crecimiento, tras 2-3 h), momento en el que se realizó la inducción de la expresión de la proteína mediante adición de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich™) a concentración final de 1 mM. Las proteínas fueron producidas a 18 °C durante 18 h en agitación.

### 4.2. Extracción de proteínas bacterianas

La extracción de proteínas bacterianas se efectuó desde muestras de 500 µL de cultivo previas a la inducción y al final de la fase de producción, a fin de observar el resultado de la inducción de la expresión. Las muestras se centrifugaron en microcentrífuga a 4.000 rpm durante 15 min a 4 °C y los *pellets* se resuspendieron en 100 µL de *buffer* NuPAGE® LDS *Sample Buffer* 2x (Invitrogen™) suplementado con DTT (ditiotreitól) 10 mM (Sigma-Aldrich™). Seguidamente, se hirvieron a 99 °C durante 5 min para su desnaturalización completa. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis por SDS-PAGE.

### 4.3. Purificación de proteínas recombinantes

Para la purificación de las proteínas recombinantes etiquetadas con GST, se comenzó recogiendo el cultivo bacteriano por centrifugación a 3.000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se resuspendió en *buffer* de resuspensión (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 1 µg/mL de cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina + aprotinina + pepstatina A + benzamidina) (Sigma-Aldrich™) + 1 µg/mL de cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich™) + 1 mM PMSF + 1 mM NaF en H<sub>2</sub>O Milli-Q) hasta un volumen de 32 mL. Seguidamente, la lisis bacteriana se realizó por incubación con lisozima (Sigma-Aldrich™) a concentración final de 1 mg/mL durante 15 min en hielo. Para fragmentar el ADN, se sonicó durante 5 min con pulsos de 30 seg a 4 °C. Para la extracción proteica, se añadieron Tritón X-100 a concentración final del 1% (3.2 mL de 10% Tritón X-100) y NaCl a concentración final



de 0.5 M (3.2 mL de NaCl 5M). El extracto se clarificó por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C, recogiendo finalmente el sobrenadante.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con gotas (*beads*) de L-glutación–sefarosa 4B (GE Healthcare Life Sciences™). Se lavaron 700 µL de *beads* con *buffer* de lavado de alta concentración salina (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA + 1% Tritón X-100 + 0.5 M NaCl + 1 mM PMSF + 1 mM DTT en H<sub>2</sub>O Milli-Q) hasta llenar un tubo de 15 mL, que se centrifugó a 1.400 rpm durante 2 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante. El sobrenadante de extracto proteico obtenido anteriormente se incubó con las *beads* lavadas durante 1 h a 4 °C en un tubo de 50 mL sometido a rotación continua. Tras ello, se centrifugó a 1.500 rpm durante 3 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante, obteniéndose un *pellet* de *beads* con la proteína unida. Éste se sometió a 4 lavados con 10 mL de *buffer* de lavado de alta concentración salina, centrifugando a 1.500 rpm durante 2 min a 4 °C y descartando el sobrenadante. A esto siguieron 3 lavados análogos con *buffer* de lavado de baja concentración salina (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA + 50 mM NaCl + 1 mM PMSF + 1 mM DTT en H<sub>2</sub>O Milli-Q), centrifugando a 4.000 rpm en el último a fin de obtener un *pellet* más consistente. Para la elución de la proteína de las *beads*, se añadieron 200 µL de *buffer* de elución (50 mM Tris pH 8.0 + 1 mM EDTA + 0.1 mM EGTA + 50 mM NaCl + 1 mM PMSF + 1 mM DTT en H<sub>2</sub>O Milli-Q) y 500 µL de L-glutación (L-GSH) 200 mM (preparado en 50 mM Tris pH 8). La mezcla se incubó en hielo 15 min, con agitación suave cada 2-3 min. Seguidamente, se centrifugó a 1.400 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió en un vial de 1.5 mL y el *pellet* se sometió a una nueva ronda de elución. Se unificaron los sobrenadantes en un mismo vial, que se sometió a una última centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min a 4 °C en microcentrífuga. Finalmente, se recogió el sobrenadante con la proteína purificada.

Las proteínas se reconcentraron mediante ultrafiltración por centrifugación usando un sistema Vivaspín® 6 con membrana 10.000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech™). Se siguieron las instrucciones del proveedor, centrifugando a 3.000 rpm durante 30 min a 4 °C. Las proteínas purificadas se almacenaron indefinidamente a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el *método de Bradford*.

#### 4.4. Electroforesis desnaturalizante de proteínas (SDS-PAGE)

La identidad y pureza de las proteínas purificadas se comprobaron atendiendo a su peso molecular mediante separación por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (dodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). Ésta se llevó a cabo como se describe en el apartado correspondiente al *Western blotting*. Se separaron 7.5 µL de extracto proteico bacteriano y cantidades variables de proteína purificada. Los extractos proteicos bacterianos se desnaturalizaron previamente hirviendo a 99 °C durante 5 min.

Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de *Coomassie*. Ésta se realizó incubando los geles con solución de tinción de *Coomassie* (0.1% *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (Sigma-Aldrich™) + 10% ácido acético + 40% metanol en H<sub>2</sub>O Milli-Q) durante 1 min al microondas a máxima potencia hasta hervir, seguido de 10 min a temperatura ambiente en agitación. Tras ello, se eliminó el colorante y se enjuagó 2 veces con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Seguidamente, se aplicó solución de desteñido (20% metanol + 10% ácido acético en H<sub>2</sub>O Milli-Q), incubándose durante 1 min al microondas a máxima potencia hasta hervir, seguido de 10 min en agitación, aplicando al recipiente toallitas de papel secante. Se reemplazó con solución de desteñido fresca y nuevas toallitas secantes, se volvió a hervir 1 min al microondas a máxima potencia, y se dejó destiñendo a temperatura ambiente en agitación durante varias horas o toda la noche, hasta que se observaron bandas teñidas bien definidas.

#### 4.5. Filtración en gel con sistema FPLC

Para microscopía electrónica, la proteína se limpió de contaminantes y se trataron de obtener las fracciones con menor índice de oligomerización mediante un paso adicional de purificación por filtración en gel en una columna Superdex® 200 acoplada a un sistema FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas, *fast protein liquid chromatography*) (ÄKTA FPLC, GE Healthcare Life Sciences™). La columna se equilibró con *buffer* de equilibrado (50 mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 0.5 mM EDTA + 10% glicerol + 1 mM DTT en H<sub>2</sub>O Milli-Q). Se aplicaron 0.5 mL de muestra a concentración < 0.05 mg/mL a un flujo de 0.5 mL/min, recogiendo fracciones de 0.5 mL. Las muestras con mayor contenido proteico del peso molecular deseado se determinaron en base al cromatograma obtenido. Este procedimiento se realizó con la colaboración de Santiago Ramón (Grupo de Bases Estructurales de la Integridad Genómica, CNIO).

### 5. Análisis de proteínas

#### 5.1. Extracción de proteínas celulares

Los extractos de proteínas celulares totales (WCEs, *whole-cell extracts*) se obtuvieron por lisis de las células recogidas mediante raspado con solución RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4 + 1% NP-40 + 0.25% desoxicolato sódico + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA en H<sub>2</sub>O Milli-Q) suplementada con inhibidores de proteasas (1 µg/mL de cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina + aprotinina + pepstatina A + benzamidina) (Sigma-Aldrich™) + 1 mM PMSF + 1 mM NaF) y de fosfatasa (1 µg/mL de cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma-Aldrich™)). Se añadió a una proporción aproximada de 50 µL por pocillo de P6 y la mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Luego, se centrifugó a 13.500 rpm durante 15 min a 4 °C en microcentrífuga. Se recogió el sobrenadante proteico y se conservó indefinidamente a -80 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el *método de Bradford*.

## 5.2. Fraccionamiento de cromatina

Este protocolo de fraccionamiento bioquímico (Méndez y Stillman, 2000) permite la separación de las proteínas celulares en fracciones citosólica, nucleoplásmica y cromatínica/matriz nuclear.

Las células, recogidas por rascado, se resuspendieron en *buffer* A (10 mM HEPES pH 7.9 + 10 mM KCl + 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> + 0.34 M sacarosa + 10% glicerol en H<sub>2</sub>O Milli-Q) frío suplementado con 1 mM DTT e inhibidores de proteasas (1 µg/mL de cóctel de inhibidores de proteasas (leupeptina + aprotinina + pepstatina A + benzamidina) (Sigma-Aldrich™) + 1 mM PMSF + 1 mM NaF) y de fosfatasas (1 µg/mL de cóctel de inhibidores de fosfatasas (Sigma-Aldrich™)), a razón de  $2.5 \cdot 10^7$  células/mL. Seguidamente, se añadió Tritón X-100 a concentración final del 0.1%, y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 4 min a 4 °C en microcentrífuga. El sobrenadante (S1) se mantuvo en hielo y el *pellet* (P1, núcleos intactos), se lavó con el mismo volumen de *buffer* A suplementado (sin Tritón X-100) frío que en el primer paso, centrifugando a 3.500 rpm durante 4 min a 4 °C y descartándose el sobrenadante. Seguidamente, el *pellet* P1 se resuspendió en *buffer* sin sal (3 mM EDTA + 0.2 mM EGTA en H<sub>2</sub>O Milli-Q) frío suplementado con 1 mM DTT e inhibidores de proteasas y de fosfatasas, usando el mismo volumen que en el primer paso. Esta mezcla se incubó durante 30 min en hielo, con agitación suave ocasional. Durante este tiempo, el sobrenadante S1, mantenido en hielo, se centrifugó a 13.500 rpm durante 15 min a 4 °C, recogiendo el sobrenadante (S2, fracción citosólica) y desechándose el *pellet* (P2, con restos celulares, difícilmente visible). Tras su tiempo de incubación, se centrifugaron los núcleos P1 a 4.000 rpm durante 4 min a 4 °C, recogiendo el sobrenadante (S3, fracción nucleoplásmica) y conservando el *pellet* gelatinoso translúcido (P3, fracción cromatínica y matriz nuclear). El *pellet* P3 se lavó con el mismo volumen usado anteriormente de *buffer* sin sal suplementado frío por centrifugación a 4.000 rpm durante 4 min a 4 °C, descartando cuidadosamente el sobrenadante. Seguidamente, el *pellet* P3 se resuspendió en tampón NuPAGE® LDS *Sample Buffer* 4x (Invitrogen™) usando el mismo volumen que a lo largo de todo el procedimiento. En el momento de su utilización para *Western blot*, se desnaturalizó hirviendo a 99 °C durante 5 min. Las fracciones proteicas obtenidas (S2, S3 y P3) se conservaron indefinidamente a -80 °C.

El protocolo se optimizó para células ES usando  $10^7$  células recogidas al 90% de confluencia y una incubación en hielo de 5 min con detergente NP-40 a concentración final del 0.5%, en lugar de Tritón X-100 al 0.1%.

## 5.3. Western blotting

Los extractos proteicos se complementaron con tampón de carga NuPAGE® LDS *Sample Buffer* 1x (Invitrogen™) con DTT (ditiotreitól) 10 mM (Sigma-Aldrich™). Según el caso, se cargaron en los pocillos 35 µg de extracto proteico total (WCE), la máxima cantidad posible de proteína hasta llenar el volumen del pocillo para fracciones proteicas solubles (S2 y S3), 12 µL de fracción cromatínica (P3

resuspendida) o 15 µg de proteína purificada. Las fracciones cromatínicas se desnaturalizaron previamente hirviendo a 99 °C durante 5 min.

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (dodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE, *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). Se utilizaron geles NuPAGE Novex® (Invitrogen™) de gradiente de Bis-Tris-poliacrilamida (4-12%), con sus correspondientes tampones (MOPS o MES) con SDS. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) Hybond® (Amersham Biosciences™) mediante electrotransferencia húmeda (2 h a 100 V en hielo, o bien toda la noche a 30 V a 4 °C). Tras ello, las membranas se tiñeron con rojo *Ponceau* (Sigma-Aldrich™). Previamente a la incubación, las membranas fueron bloqueadas de forma estándar en solución de bloqueo (TBS-T (0.1% Tween20 en TBS) + 5% leche en polvo (Central Lechera Asturiana™)) durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (Tabla 9) diluidos en solución de bloqueo se incubaron durante toda la noche a 4 °C con agitación. Los anticuerpos secundarios (Tabla 10), conjugados a fluorocromos de emisión infrarroja, diluidos en solución de bloqueo, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación en oscuridad. Después de cada incubación con anticuerpo se realizaron 3 lavados con TBS-T de 10 min a temperatura ambiente con agitación. Las membranas fueron analizadas en un escáner de infrarrojos LI-COR® (LI-COR® Biosciences™), con la correspondiente captura de imágenes. Tras ello, se conservaron indefinidamente en TBS a 4 °C.

Anticuerpo	Banda (KDa)	Origen	Especificidad	Dilución	Proveedor
<b>anti-53BP1</b>	217	Conejo	Humano, Ratón	1:1.000	Novus Biologicals™
<b>anti-BLM</b>	159	Conejo	Humano, Ratón	1:1.000	Raimundo Freire, Hosp. Univ. Canarias
<b>anti-CtIP</b>	102	Ratón	Humano	1:1.000	Richard Bae, <i>Columbia Univ. Med. Center</i>
<b>anti-FLAG</b>	Según fusión	Ratón	Epítipo FLAG	1:2.000	Agilent Technologies™
<b>anti-GFP</b>	Según fusión	Ratón	Etiqueta GFP	1:1.000	Roche™
<b>anti-GST</b>	Según fusión	Ratón	Etiqueta GST	1:1.000	Cell Signaling Technology™
<b>anti-H3 Total</b>	17	Ratón	Mamíferos	1:2.000	Abcam™
<b>anti-H4K20me<sub>2</sub></b>	10	Ratón	Humano, Ratón, Rata, Vaca	1:10.000	Upstate™
<b>anti-MSH6</b>	160	Conejo	Humano, Ratón, Rata, Mono	1:1.000	Cell Signaling Technology™
<b>anti-MUS81</b>	61	Ratón	Humano, Ratón	1:1000	Abcam™
<b>anti-SMC2</b>	143	Conejo	Humano	1:400	Grupo de Dinámica Cromosómica, CNIO
<b>anti-α-Tubulina</b>	49.5	Ratón	Todos	1:5.000	Sigma™

**Tabla 9 | Listado de anticuerpos primarios usados para Western blot.**

Anticuerpo	Origen	Especificidad	Color	Dilución	Proveedor
<b>anti-IgG<sup>Conejo</sup> – AlexaFluor680</b>	Cabra	Conejo	IR 680 nm	1:2.000	Molecular Probes®, Invitrogen™
<b>anti-IgG<sup>Conejo</sup> – IRDye800CW</b>	Cabra	Conejo	IR 800 nm	1:2.000	LI-COR® Biosciences™
<b>anti-IgG<sup>Ratón</sup> – AlexaFluor680</b>	Cabra	Ratón	IR 680 nm	1:2.000	Molecular Probes®, Invitrogen™
<b>anti-IgG<sup>Ratón</sup> – IRDye800CW</b>	Cabra	Ratón	IR 800 nm	1:2.000	LI-COR® Biosciences™

**Tabla 10 | Listado de anticuerpos secundarios usados para Western blot.**

## 5.4. Dinámica de unión a la cromatina por FRAP

La técnica de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo) se basa en la recuperación de la fluorescencia (debida a proteínas marcadas fluorescentemente, expresadas previa transfección) en regiones celulares concretas tras ser sometidas a un apagado de ésta por sobreexcitación con láser. Una cinética de FRAP rápida se debe a amplia movilidad de las proteínas en su medio, lo que en el núcleo sería indicativo de baja afinidad por la cromatina. En contraposición, una cinética de FRAP lenta se traduce en retención de la proteína en el medio, en el caso del núcleo debida a alta afinidad por la cromatina.

### ▪ FRAP convencional:









Distintos plásmidos codificantes de proteínas quiméricas fusionadas a GFP o mRFP se transfectaron mediante electroporación Neon en células en crecimiento exponencial ( $\approx 80\%$  de confluencia), sembrándose en placas P35 con fondo de cristal MatTek® (MatTek Corporation™) tratadas con gelatina al 0.1% o bien sobre cubreobjetos circulares de 20 mm de diámetro (previamente esterilizados al UV y tratados con gelatina al 0.1%) en pocillos de placas *multiwell* P6, a razón de 250.000 PMEFs, 500.000 iMEFs 53BP1 KO o 1.500.000 células ES por P35 o pocillo de P6. Los experimentos de FRAP se realizaron en un microscopio Leica TCS SP5 AOBs® (Leica Microsystems™) con un objetivo 63× de agua con una apertura numérica de 1.4, provisto de una cámara a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Los láseres utilizados fueron UV 351+364 nm, Argón 488 nm, Diodo 531 nm y HeNe 633 nm. Se escogieron células con niveles adecuados de expresión de las proteínas fluorescentes y se seleccionó una región de interés (ROI, *region of interest*) dentro del núcleo. Se realizaron 3 capturas de pre-blanqueo (*pre-bleach*) a 1 *frame/seg*, 5 exposiciones de blanqueo (*bleach*) de 0.876 seg con una captura, 30 capturas de post-blanqueo (*post-bleach*) a 1 *frame/seg* y otras 24 como mínimo a 1 *frame/5 seg* en cada núcleo analizado. Se midió la recuperación de la señal fluorescente usando la media de intensidad de fluorescencia de la ROI normalizándola con la intensidad de fluorescencia de una región control dentro del mismo núcleo. Para cada tiempo, se dividió el valor de fluorescencia de la ROI por el de la región control, para obtener un valor de fluorescencia relativo. Después, los datos se normalizaron al 100% con los valores de fluorescencia antes del fotoblanqueo. Para cada condición, se realizaron 5-10 experimentos, de cuyos datos se hizo la media con las desviaciones típicas. Las cinéticas de FRAP se representaron en gráficas de intensidad de fluorescencia respecto al tiempo.

### ▪ FRAP en un punto:

Para el FRAP en un punto diminuto en vez de en una ROI, el microscopio se usó en modo resonante, que permite medir cinéticas más rápidas o en regiones muy reducidas. En este caso, las condiciones especiales empleadas fueron las siguientes: *Bleach*: 0.200 seg; potencia láser Ar: 50%; línea 488: 100%; zoom: 3×; velocidad: 600 Hz; ROI: + (un punto).

## 5.5. Ensayo de unión a ADN (EMSA)

La unión de proteínas a ADN se estudió mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*). La sonda de ssDNA de 60 nt se preparó marcando radiativamente el oligonucleótido A (Tabla 11) en posición 5' con  $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP y polinucleótido kinasa (PNK). Las distintas estructuras de ADN usadas como sondas se generaron hibridando la sonda marcada A\* con diferentes oligonucleótidos (Tabla 11), todos ellos cedidos amablemente por el Grupo de Replicación de ADN, CNIO. Las reacciones de unión ADN:proteína se realizaron incubando 2  $\mu$ g de proteína con 150 fmol ( $\approx$ 5.000 cpm) de sonda, en *buffer* EMSA (50 mM Tris-HCl pH 8 + 100 mM NaCl + 0.5 mM EDTA + 10% glicerol + 1 mM DTT) en un volumen final de 20  $\mu$ L a 25 °C durante 30 min. Tras la incubación, las muestras se resolvieron por electroforesis a 10 V/cm en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 5% en TBE (89 mM Tris + 89 mM ácido bórico + 2 mM EDTA) durante 3 h. Tras la electroforesis, los geles se secaron sobre papel Whatman® 3MM para su autorradiografía. Ésta se obtuvo por exposición con una pantalla de PhosphorImager® (Molecular Dynamics™) durante toda la noche, que se leyó con escáneres Storm 820 PhosphorImager® y Typhoon 9400 PhosphorImager® (Amersham Biosciences™), digitalizándose la imagen con el software *ImageQuant TL* (GE Healthcare Life Sciences™).

Sonda	Oligonucleótido
<b>1</b>  A* ssDNA	(A) 5' ACTGCGCGTCGTTTTACAAC <b>GTCTGACTGGGAAAACCT</b> GGCGTTACCCAACTTAATCG 3'
<b>2</b>  A*:Ac dsDNA	(Ac) 5' <b>CGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC</b> GTTGTAAAACGACGGCCAGT 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>3</b>  A*:B 5'-Overhang	(B) 5' <b>CGATTAAGTTGGGTAACGCC</b> 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>4</b>  A*:C 3'-Overhang	(C) 5' <b>GTTGTAAAACGACGGCCAGT</b> 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>5</b>  A*:D Central dsDNA	(D) 5' <b>AGGGTTTTCCAGTCACGAC</b> 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>6</b>  A*:E:F Fork	(F) 3' <b>GGCTGGACCATGCAAAGC</b> 5' (E) 5' <b>CGATTAAGTTGGGTAACGCC</b> TTCCGACCTGGTACGTTTCG 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>7</b>  A*:G Bubble	(G) 5' <b>CGATTAAGTTGGGTAACGG</b> TCCCAAAGGGTCAGTGCTG <b>CA</b> TGTAAAACGACGGCCAGT 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5'
<b>8</b>  D:A*:E:F 3-Way DNA Junction ("Chicken Foot")	(F) 3' <b>GGCTGGACCATGCAAAGC</b> 5' (E) 5' <b>CGATTAAGTTGGGTAACGCC</b> TTCCGACCTGGTACGTTTCG 3' (A) 3' GCTAATTCAACCCATTGCGGT <b>TCCCAAAGGGTCAGTGCTG</b> CAACATTTTGCTGCCGGTCA 5' (D) 5' <b>AGGGTTTTCCAGTCACGAC</b> 3'

**Tabla 11 | Oligonucleótidos y sondas usados para los ensayos de unión a ADN.** Las distintas sondas son distintas estructuras de ADN y se generaron por hibridación de un oligonucleótido marcado inicialmente con otros diseños específicamente (proporcionados por el Grupo de Replicación de ADN, CNIO). Las secuencias se tomaron del fago M13.



## 6. Análisis de ARN

### 6.1. Extracción de ARN

Para efectuar la lisis celular, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de reactivo TRIzol® (Invitrogen™) directamente a la placa de cultivo. La suspensión se homogeneizó por pipeteos sucesivos y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se procedió a la extracción orgánica. Se añadieron 0.4 volúmenes de cloroformo y, después de agitar enérgicamente la muestra durante 15 seg, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Para favorecer la separación entre ambas fases, se centrifugó a 13.500 rpm durante 15 min en una microcentrífuga. Se recogió la fase acuosa y se le añadió lentamente 1 volumen de etanol 70%. A continuación, se realizó una purificación cromatográfica de ARN utilizando el kit comercial *RNeasy Midi Kit*® (Qiagen™), que comprende un tratamiento con DNasa. La muestra se eluyó con H<sub>2</sub>O libre de RNasas y se almacenó a -80 °C. Su calidad se evaluó con el sistema *BioAnalyzer*® (Agilent Technologies™).

### 6.2. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

El *knock-down* de *GEN1* y *SLX4* humanos se verificó por qRT-PCR. Se emplearon 0.6 µg de ARN de cada muestra en una mezcla de reacción con fluoróforo SYBR Green, según las instrucciones del kit *SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit* (Invitrogen™). La curva se normalizó con la de los niveles del gen control *GAPDH* para cada muestra. Los *primers* empleados fueron:

- GEN1\_human-RT-Fw: 5'- CCA CAT GAC TAT GAA TAC TGC TGT CCT T -3'
- GEN1\_human-RT-Rv: 5'- TGG GAA TCC CTC ACA ACA GCA AGC -3'
- SLX4\_human-RT-Fw: 5'- CCT GGA GGA AAA GGG TTT GT -3'
- SLX4\_human-RT-Rv: 5'- AGC TTC ATC CAA GCA CCT GT -3'

## 7. Ensayos funcionales *in vivo*

### 7.1. Ensayo de formación de focos inducidos por radiación ionizante (IRIF)

Células sembradas en pocillos de placas P24 sobre cubreobjetos de cristal esterilizados al UV y tratados con gelatina al 0.1%, a una densidad de 30.000 células/pocillo (PMEFs) o de 50.000 células/pocillo (iMEFs *53BP1* KO), fueron irradiadas con radiación ionizante y a diferentes dosis (en Gy) en un irradiador con fuente de cesio en condiciones de esterilidad. Seguidamente, se dejaron en recuperación en el incubador de cultivos a 37 °C hasta que llegó el momento de su fijación para posterior tinción inmunofluorescente.

## 7.2. Ensayo de reclutamiento láser

Estos experimentos fueron realizados por nuestro colaborador Jiri Lukas (*Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research*, Copenhague, Dinamarca). Se basan en transfectar plásmidos codificantes de las proteínas de interés etiquetadas fluorescentemente (en nuestro caso, con GFP) e, *in vivo*, hacer pasar por una región discreta del núcleo un halo láser UV de alta energía que genera DSBs localizadas. Las proteínas que reconocen la lesión y se reclutan a las DSBs aumentan progresivamente su intensidad de fluorescencia en la región dañada.

## 7.3. Ensayo de apoptosis inducida por cisplatino

El fundamento de este tipo de ensayos fue descrito por de Wind *et al.*, 1999, y por Yang *et al.*, 2004. Células plaqueadas a una densidad de 1.500.000 (células ES) o 250.000 (PMEFs) células por pocillo de placa P6 se trataron 24 h después, en fase de crecimiento exponencial, con cisplatino (*cis*-Pt) [*cis*-diaminodicloroplatino (II)] (Sigma-Aldrich™) a concentración 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M (células ES) o 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M (PMEFs), potente agente inductor de apoptosis mediante la formación de entrecruzamientos con el ADN. El tratamiento se llevó a cabo durante 18 h a 37 °C en condiciones de normoxia. Tras ello, se aplicó un protocolo de detección de células apoptóticas mediante tinción con Anexina V–APC (proteína de unión específica a la fosfatidilserina externalizada en la membrana plasmática de células apoptóticas tempranas, conjugada con aloficocianina, fluoróforo rojo) y yoduro de propidio (PI) (colorante de ADN, marcador de viabilidad celular). Para ello, primero se recogieron tanto los sobrenadantes de las placas como las células tripsinizadas, y se centrifugaron para obtener un *pellet* celular. Se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en el *buffer* de unión de la Anexina V (BD Biosciences™) (previamente diluido en H<sub>2</sub>O Milli-Q de 10x a 1x) ajustando la concentración celular a  $3 \cdot 10^6$  células/mL. A cada tubo de citometría se añadieron 100  $\mu$ L de suspensión celular, 5  $\mu$ L de Anexina V–APC (BD Biosciences™) y 10  $\mu$ L de PI (Sigma-Aldrich™) a 1 mg/mL. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras ello, se añadieron 400  $\mu$ L de *buffer* de unión de la Anexina V (BD Biosciences™) 1x a cada tubo. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (FACS) en los citómetros analizadores FACSCalibur® y FACSCanto II® (Becton Dickinson™). Las células vivas no incorporan ni Anexina V ni PI, las apoptóticas tempranas sólo Anexina V, las apoptóticas tardías tanto Anexina V como PI, y las necróticas o ya muertas sólo PI.

## 7.4. Ensayo de inestabilidad de microsatélites (MSI)

Para este ensayo se usó un sistema informador (“reportero”, *reporter*) de inestabilidad de microsatélites (MSI, *microsatellite instability*), proporcionado por Chengtao Her (*Center for Reproductive Biology, Washington State University, Washington, USA*) y descrito por Vo *et al.*, 2005. El sistema está constituido por un plásmido control pRFP (pmRFP-N1) con el gen *RFP* expresándose (indicador de transfección), y otro plásmido pA-OF con la secuencia del gen *GFP* precedida por



repeticiones de As (microsatélite (A)<sub>n</sub>), lo que hace que *GFP* no conserve el marco de lectura desde el promotor (*out-of-frame*, OF). Otro plásmido similar es pCA-OF, que incluye el microsatélite (CA)<sub>n</sub>. Las repeticiones del microsatélite tienden a desorganizarse por “deslizamiento”, originándose bucles de inserción/delección (IDLs, *insertion/deletion loops*), que son interpretados como apareamientos erróneos. Si la maquinaria de reparación de apareamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*) funciona correctamente, estos errores se corrigen y sigue sin expresarse *GFP*. Pero si hay defectos en MMR, la desorganización del microsatélite, no corregida, modifica el marco de lectura, posibilitándose que se mantenga con la secuencia *GFP* (*in-frame*), con lo que se expresa esta proteína y pueden apreciarse algunas células verdes.

Se cotransfectaron mediante electroporación Neon las parejas de plásmidos pmRFP + pA-OF y pmRFP + pCA-OF, junto a los controles pmRFP y sin transfección, en células ES o PMEFs, que se sembraron a razón de, respectivamente, 1.000.000 o 125.000 células por pocillo de placa P6. 48 horas después, se analizó por citometría de flujo (FACS) en los citómetros analizadores FACSCalibur® y FACSCanto II® (Becton Dickinson™) la relación entre el porcentaje de células verdes y el de células rojas, sustrayendo en cada caso los valores de los controles.

## 8. Análisis de ciclo celular y proliferación

### 8.1. Etiquetado con EdU para HTM

El procedimiento se ha descrito previamente en el apartado correspondiente a tinciones inmunofluorescentes (3.9).

### 8.2. Tinción con PI para FACS

El yoduro de propidio (PI) es un colorante que tiñe al ADN al intercalarse en su estructura. Al aplicar esta tinción sobre células en cultivo asíncrono fijadas y analizar la señal del PI por FACS, se obtiene un histograma que muestra el número de células con un determinado contenido de PI, esto es, de ADN, representación que constituye el denominado “perfil de ciclo celular”.

Esta tinción se aplicó sobre células U2OS en cultivo asíncrono en fase exponencial de crecimiento. Se tripsinizaron para obtener una suspensión celular, a la que se aplicó recuento celular. Tras ello, se obtuvo un *pellet* celular por centrifugación a 1.400 rpm durante 5 min en centrífuga de mesa, que se lavó con PBS. A continuación, las células se fijaron en suspensión con agitación suave al vórtex con etanol 70% frío (mantenido a -20 °C), del que se añadió un volumen de 1 mL por cada millón de células. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min y se almacenó a -20 °C durante toda la noche. Seguidamente, las células se centrifugaron a 6.500 rpm durante 5 min en microcentrífuga, y el

*pellet* se lavó 2 veces con PBS centrifugando a 4.000 rpm durante 3 min en microcentrífuga. A continuación, se realizó la permeabilización por resuspensión en 1 mL de solución de permeabilización (0.25% Tritón X-100 en PBS) e incubación en hielo durante 15 min. Tras ello, se centrifugó a 4.000 rpm durante 3 min en microcentrífuga y se eliminó el sobrenadante. Para la tinción, el *pellet* se resuspendió en 500 µL de PBS + 10 µg de PI + 100 µg de RNasa A. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Tras ello, se procedió al análisis de las muestras por citometría de flujo (FACS) en un citómetro analizador BD LSRFortessa® (Becton Dickinson™), obteniéndose finalmente las representaciones de los perfiles de ciclo celular.

## **9. Microscopía óptica**

### **9.1. Microscopía de fluorescencia convencional**

En la mayor parte de los experimentos de inmunofluorescencia, la adquisición de imágenes se realizó a temperatura ambiente en un microscopio de fluorescencia Zeiss Imager Z1® (Zeiss™) con tecnología ApoTome® y una cámara digital CCD ORCA® 1394 (Hamamatsu™). Se utilizó aceite como medio de inmersión para obtener imágenes de alta definición con los objetivos 40×, 63× y 100× (Zeiss™), capturadas mediante el software *AxioVision*® (Zeiss™).

### **9.2. Microscopía confocal**

En ciertos casos, las imágenes de los experimentos de inmunofluorescencia se obtuvieron con los microscopios confocales Leica TCS SP2 AOBS® y SP5 AOBS® (Leica Microsystems™), con objetivos 40×, 63× y 100× (Leica™) y usando el software *Leica Confocal Software LCS*® (Leica™). Los experimentos de FRAP se realizaron en el microscopio Leica TCS SP5 AOBS® (Leica Microsystems™) por el procedimiento descrito en el apartado correspondiente, montando las imágenes en vídeos con el mismo programa.

La reconstrucción estructural tridimensional de los puentes de 53BP1-RPA (53RBs) se realizó en un microscopio confocal Leica TCS SP5-WLL® (Leica Microsystems™), equipado con un láser de luz blanca que permite eliminar cualquier solapamiento entre canales. Se tomaron imágenes de diferentes secciones seriadas, se realizó un montaje en Z (*Z-stack*) y se procesó con el software *Imaris*® 7.3.1 (Bitplane™) para obtener un modelo 3D de la estructura, que se manejó en distintos vídeos.

### **9.3. Microscopía confocal de súper-resolución (STED)**

La microscopía STED (*stimulated emission depletion*, de depleción de emisión estimulada) es un método de súper-resolución basado en la obtención de imágenes confocales de fluorescencia, en el cual

las imágenes son adquiridas por escaneo de un punto de luz enfocado a lo largo de una región de interés y recolección de la fluorescencia secuencialmente píxel a píxel. Sólo se capta señal emitida a 488 nm (verde), pero se pueden visualizar dos canales de fluoróforos con diferente longitud de onda de excitación, aunque la de emisión sea la misma. Se visualizaron en una muestra puentes de 53BP1-RPA (53RBs) con súper-resolución, usando un microscopio Leica TCS SP8 STED® (Leica Microsystems™).

#### 9.4. Microscopía de alto rendimiento (HTM)

La microscopía de alto rendimiento (HTM, *high-throughput microscopy*) permite la realización de escrutinios de alto contenido (HCS, *high-content screenings*). Se basa en la adquisición automatizada de imágenes, que posteriormente pueden ser procesadas por un software para la delimitación de regiones de interés en función de parámetros visuales. Se identifican así como objetos individuales que son contados, para ofrecer finalmente una serie de datos numéricos de estos parámetros. Para cada pocillo de una placa *multiwell* P96, es posible obtener el número de núcleos teñidos con DAPI y, para cada uno de ellos, la intensidad de fluorescencia en un determinado canal y el número de objetos emitiendo señal en un determinado canal (en nuestro caso, focos de 53BP1) que hay en su interior. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de lectura automatizada Opera® *High Content Screening System* (Perkin Elmer™) y el análisis de imagen se realizó con el software *Acapella*® (Perkin Elmer™).

### 10. Microscopía electrónica

Las uniones ADN:proteína se observaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*), con la colaboración de Santiago Ramón (Grupo de Bases Estructurales de la Integridad Genómica, CNIO). En la TEM, haces de electrones chocan con la muestra, de modo que se visualizan como zonas oscuras las que presentan mayor resistencia al paso.

Se incubaron 0.4-0.5 µg de proteína purificada con un ADN bicatenario inespecífico (procedente de un amplicón de PCR de ≈800 pb) en un *buffer* de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8 + 150 mM NaCl + 0.5 mM EDTA + 10% glicerol + 1 mM DTT en H<sub>2</sub>O Milli-Q) análogo al usado para EMSA, durante 30 min a 25 °C. Las muestras se aplicaron sobre rejillas de microscopía de cobre-rodio recubiertas de carbono a las que se aplicó descarga iónica en un sistema de vacío, lo que genera un plasma y electrifica la superficie hidrofóbica de carbono para permitir la adhesión de la muestra. La tinción negativa de la muestra se realizó aplicando una solución acuosa de acetato de uranilo al 2% p/V. Las muestras se observaron a través de un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230® (JEOL™) a un voltaje de 100 KV. Las micrografías se recogieron a una amplificación de 40.000× y 60.000×, y se digitalizaron usando un escáner Minolta Dimage Scan Multi PRO® (Konika Minolta™).

## 11. Análisis bioinformático

### 11.1. Proteínas y dominios de la DDR

Este análisis se llevó a cabo gracias a la colaboración de Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, Instituto de Medicina Predictiva y Personalizada del Cáncer (IMPCC), Badalona). Se trata de un análisis estadístico donde un conjunto de proteínas (las de la DDR) se desglosa en los dominios que las constituyen, obteniéndose el grado de hiperrepresentación relativa de cada uno de ellos en dicho subconjunto (la DDR) en comparación con todo el proteoma humano.

### 11.2. Búsqueda de nuevos dominios proteicos

De nuevo, esta labor se debe a la colaboración de Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, Instituto de Medicina Predictiva y Personalizada del Cáncer (IMPCC), Badalona). El procedimiento se basa en la aplicación de los denominados modelos ocultos de Markov (HMMs, *hidden Markov models*) para la búsqueda de homólogos remotos en alineamientos múltiples de todas las secuencias proteicas contenidas en las bases de datos. Se detectan así dentro de la proteína de interés nuevas regiones significativamente conservadas con sus ortólogos, las cuales podrían presentar identidad como dominios o simplemente desempeñar alguna función concreta.

### 11.3. Búsqueda de residuos conservados en proteínas

Este procedimiento se aplicó para encontrar en la proteína de interés posibles residuos conservados evolutivamente cuya mutación puntual pudiera suprimir la función de la proteína. Se trata de un alineamiento múltiple de secuencias mediante el algoritmo *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), examinado con la interfaz *Jalview*<sup>®</sup>.

## 12. Análisis de datos

Las cuantificaciones de las características celulares estudiadas se llevaron a cabo por conteo en 250-500 células y cálculo de porcentajes. Se efectuaron tres réplicas por experimento, de las que se obtuvieron valores medios con sus desviaciones típicas.

El análisis de datos se efectuó de forma estándar con el software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Con él se calcularon los parámetros estadísticos principales (medias y desviaciones típicas), se obtuvieron las representaciones gráficas y se realizaron los análisis estadísticos. Los resultados de las variables se presentaron en medias  $\pm$  desviaciones típicas. La determinación de las diferencias entre tratamientos se realizó mediante análisis estadístico usando la prueba *t* de Student de

dos colas para datos no pareados. Se emplearon intervalos de confianza del 95%, considerándose las diferencias como significativas con  $p < 0.05\%$ .

Los datos de FRAP fueron analizados, procesados y representados mediante hojas de cálculo con el paquete *Microsoft Excel*® 2007 (Microsoft, Inc.).

Los datos de FACS se analizaron y se representaron con el software para citometría *FlowJo*® (Tree Star, Inc.).

Los análisis de imagen se llevaron a cabo con el programa *ImageJ*® 1.45s (NIH, USA) (<http://imagej.nih.gov/ij>).





# RESULTADOS







# RESULTADOS

## **PARTE I: Estudio del mecanismo de reclutamiento de 53BP1 a las roturas de doble cadena del ADN**

### **1. Revisión del *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1**

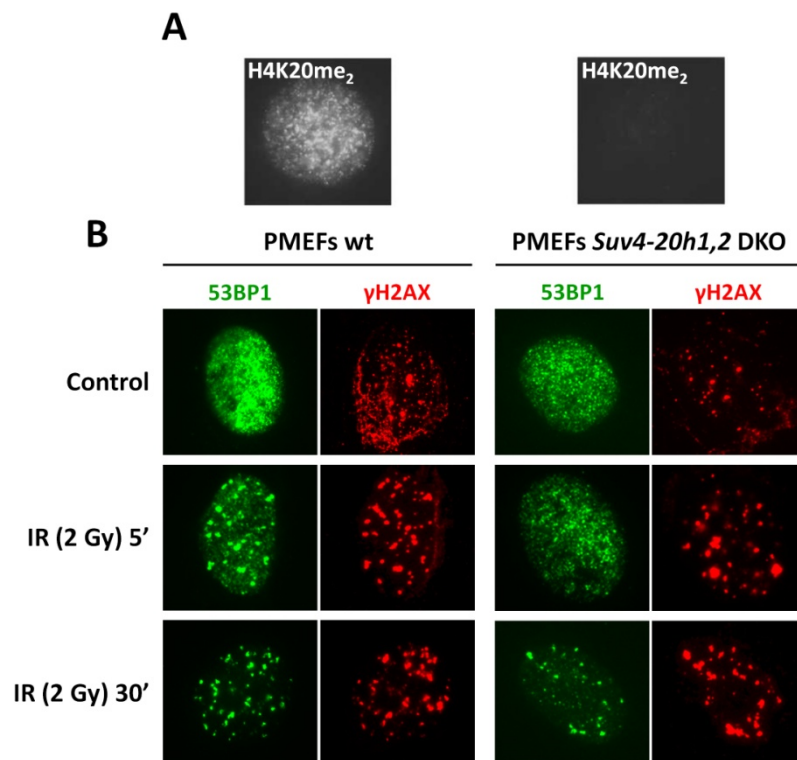
Cuando se descubrió la proteína mediadora de la DDR 53BP1 y su capacidad de formar focos o IRIF (focos inducidos por radiación ionizante, *ionizing radiation-induced foci*), uno de los grandes interrogantes a resolver fue el mecanismo por el cual es reclutada a las DSBs. Al estudiar su estructura molecular a nivel de secuencia llamó especialmente la atención la presencia de un dominio Tudor en tándem, al cual se le asignaba como función el reconocimiento de histonas metiladas, en concreto de la marca H4K20me<sub>2</sub>. Esto vinculaba directamente a 53BP1 con la Epigenética y, más en concreto, con el denominado “código de histonas” de la reparación del ADN.

Sin embargo, pronto se puso de manifiesto que la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> se encuentra presente a lo largo de todo el genoma de forma constitutiva, no estando enriquecida ni generándose *de novo* en las regiones dañadas del ADN (Introducción, apartado 5.5). Esto dificultaba enormemente la comprensión del mecanismo por el cual 53BP1 se recluta a las DSBs, que debía estar acorde con este hecho experimental. A este respecto, en el momento de inicio de esta tesis doctoral varios autores (Thanos Halazonetis, Tony Kouzarides y Junjie Chen) habían propuesto un *modelo clásico* para la formación de focos de 53BP1 (Introducción, apartado 5.5 y Figura 9), basado en la unión directa de la proteína a H4K20me<sub>2</sub> a través de su dominio Tudor en tándem, reconocimiento que sólo tendría lugar en las DSBs, donde la marca, inicialmente inaccesible y “enterrada” en la estructura del nucleosoma, quedaría expuesta. Cabe destacar que este modelo resulta meramente especulativo, no habiéndose demostrado experimentalmente. Como primera inconsistencia están las distintas opiniones entre los autores sobre qué metilación de histonas es reconocida por 53BP1. De modo más importante, resultados previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que la depleción de las enzimas relacionadas con esta dimetilación, SET8 y Suv4-20h, no elimina los focos de 53BP1, sino que los hace ineficientes (Introducción, apartado 5.6). Similares resultados se obtuvieron en células del ratón *Suv4-20h1,2* DKO (Schotta *et al.*, 2008), prácticamente carentes de H4K20me<sub>2</sub> (Introducción, apartado 5.6).

Por tal motivo, nuestro proyecto nace de la revisión del *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1, teniendo como objetivo principal explicar cómo se produce realmente el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs, así como tratar de asignar una función al dominio Tudor en tándem de 53BP1 y a la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> que esté en consonancia con los hechos experimentales y que, presuntamente, podría extenderse a otras proteínas de la DDR.

### 1.1. Los focos de 53BP1 son ineficientes en ausencia de H4K20me<sub>2</sub>

Como punto de partida, se abordó el estudio de la formación de focos de 53BP1 en células del ratón *Suv4-20h1,2* DKO, las cuales prácticamente carecen de H4K20me<sub>2</sub> por eliminación de ambas histona metiltransferasas, que son las principalmente implicadas en catalizar la dimetilación H4K20me<sub>2</sub> a partir de la forma monometilada. En los PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO, con niveles de H4K20me<sub>2</sub> prácticamente indetectables (Figura 16A), se observó que los focos de 53BP1 inducidos por radiación ionizante aún se forman, pero ineficientemente: Son más pequeños, de aparición más lenta y se hallan disminuidos en número (Figura 16B). Estos efectos se hacen más patentes a tiempos tempranos (2-5 min) tras la irradiación, mientras que a tiempos tardíos (30-60 min) parecen normalizarse con respecto a los focos formados en PMEFs wt.



**Figura 16 | Formación de focos de 53BP1 en ausencia de H4K20me<sub>2</sub>.** (A) Tinción inmunofluorescente de H4K20me<sub>2</sub> en PMEFs wt y *Suv4-20h1,2* DKO. En estos últimos, los niveles de la marca son prácticamente inapreciables. (Adaptado de Schotta *et al.*, 2008.) (B) Ensayo de formación de focos tras irradiación con 2 Gy, fijando tras ésta a 5 min (tiempo temprano) y a 30 min (tiempo tardío), incluyendo los controles no irradiados. La inmunofluorescencia de 53BP1 (verde) reveló focos ineficientes a tiempos tempranos. γH2AX (rojo) sirve como marcador de DSBs.

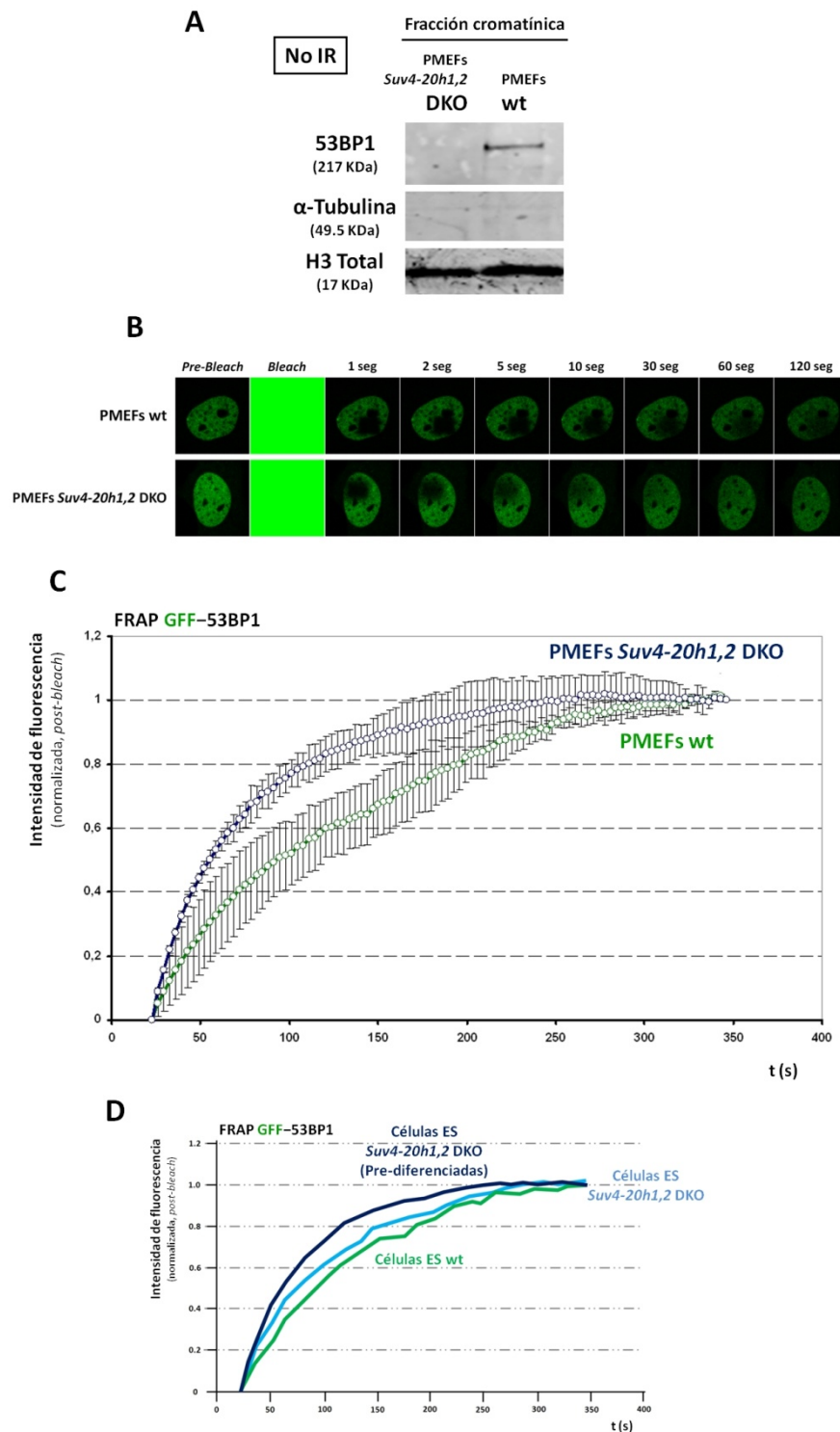
Similares resultados fueron obtenidos por Schotta *et al.*, 2008, al analizar el fenotipo de inestabilidad genómica del ratón *Suv4-20h1,2* DKO, y por Yang *et al.*, 2008, al analizar la depleción de *Suv4-20h1,2* en células HeLa. Este primer hecho experimental demuestra que la marca H4K20me<sub>2</sub> no resulta esencial para el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs, el cual sigue teniendo lugar en su ausencia, aunque de forma ineficiente. Por tanto, H4K20me<sub>2</sub> podría estar ejerciendo otra función diferente a la de reclutar a 53BP1 a las DSBs, y relacionada más bien con que el proceso se lleve a cabo de manera eficiente.

## 1.2. 53BP1 está constitutivamente unida a la cromatina sólo en presencia de H4K20me<sub>2</sub>

A fin de tratar de profundizar en la función de la marca H4K20me<sub>2</sub> y en su relación con 53BP1 a nivel de cromatina, se analizó en primer lugar la localización de la proteína por fraccionamiento bioquímico de cromatina seguido de *Western blot*. Se obtuvo que, en condiciones de no daño en el ADN, esto es, de forma constitutiva, 53BP1 está unida a la cromatina sólo en células wt, pero no en las *Suv4-20h1,2* DKO (Figura 17A). Dado que estas últimas carecen de H4K20me<sub>2</sub>, puede concluirse que esta marca es responsable de la unión constitutiva de 53BP1 a la cromatina, incluso en ausencia de daño en el ADN.

Seguidamente, se validaron estos resultados *in vivo* mediante FRAP en PMEFs wt comparados con PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO, transfectados con GFP-53BP1. En la Figura 17B puede apreciarse la recuperación de la fluorescencia en la zona blanqueada a distintos tiempos tras el fotoblanqueo, y cómo tiene lugar más rápidamente en las células *Suv4-20h1,2* DKO que en las wt (vídeo *FRAP wt vs DKO.avi* del Anexo I). Esto indica que en las primeras la proteína está unida a la cromatina de forma más lábil, puesto que puede movilizarse más rápidamente para ocupar la zona donde se ha apagado la fluorescencia. Por el contrario, en las células wt dicha difusión se encuentra más dificultada debido a una mayor afinidad de la proteína por la cromatina, lo que se traduce en que ésta tarda más tiempo en reocupar la zona blanqueada. La representación gráfica de estos fenómenos se muestra en la Figura 17C. La cinética de FRAP de 53BP1 en PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO resultó ser más rápida que en su control wt. En nuestro caso, una cinética de FRAP más rápida se traduce en menor afinidad de la proteína por la cromatina, mientras que, por el contrario, una cinética de FRAP más lenta es indicativa de mayor afinidad de la proteína por la cromatina. En definitiva, este resultado muestra que en ausencia de H4K20me<sub>2</sub> (células *Suv4-20h1,2* DKO) se pierde afinidad de 53BP1 por la cromatina.

Se trataron de reproducir los experimentos de FRAP en células ES en lugar de PMEFs, obteniéndose resultados similares (Figura 17D). Sin embargo, las diferencias son menos apreciables, probablemente debido a que el estado abierto de cromatina característico de las células ES dificulta la observación de este fenotipo. Así, en células ES *Suv4-20h1,2* DKO pre-diferenciadas las diferencias con respecto a las wt parecen ser más acusadas, poniéndose de manifiesto la cinética de FRAP más rápida.

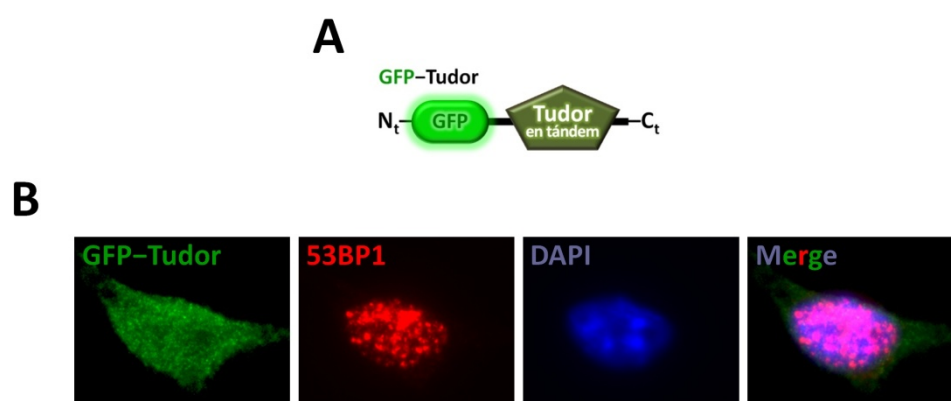


**Figura 17 | Unión constitutiva de 53BP1 a la cromatina dependiente de H4K20me<sub>2</sub>.** (A) Western blot de fracciones de cromatina procedentes de PMEFs wt (línea E3.16) y *Suv4-20h1,2* DKO (línea E46.1), desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>, en ausencia de daño en el ADN. 53BP1 se encuentra en la cromatina sólo en células wt. Se empleó la histona H3 total como control de carga de la fracción cromatinica y la  $\alpha$ -Tubulina como el de la fracción citosólica (sólo presente en la fracción soluble). (B) Fotografías de un experimento de FRAP de GFP-53BP1 a distintos tiempos tras el fotoblanqueo (*bleach*) en las mismas células, mostrando una recuperación más tardía de la fluorescencia en las wt, indicativo de una mayor afinidad por la cromatina. (C) Cinética de FRAP del experimento anterior. Se representan las intensidades de fluorescencia a distintos tiempos tras el fotoblanqueo como medias  $\pm$  desviaciones típicas de 5 experimentos independientes, normalizadas con respecto a los valores antes de éste. (D) Cinética de FRAP de GFP-53BP1 en células ES wt (línea wt26) y *Suv4-20h1,2* DKO (líneas B4-2 y B7-1♀, pre-diferenciada), análoga a la anterior pero con diferencias menos evidentes.

### 1.3. El dominio Tudor de 53BP1 no es reclutado a las DSBs

Una vez comprobado el papel de H4K20me<sub>2</sub> en la formación de focos de 53BP1, el siguiente paso fue estudiar la contribución real del dominio Tudor en tándem de 53BP1 en este proceso. Para ello, se generó una proteína quimérica de fusión GFP-Tudor (Figura 18A) (residuos 1480-1602 de 53BP1 humana), a fin de detectar su localización por microscopía de fluorescencia. La construcción génica se transfectó en células 3T3. Se observó que la proteína en ningún caso fue capaz de formar focos inducidos por radiación ionizante, usando como control los de la propia 53BP1 endógena (Figura 18B).

Este sencillo resultado posee una importancia considerable en la medida en que, de entrada, echa por tierra el *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1, que postulaba que el reclutamiento de ésta a las DSBs se produciría por la unión Tudor-H4K20me<sub>2</sub>, según lo cual el dominio Tudor por sí solo debería ser capaz de formar focos tras irradiación. Sin embargo, el hecho de que esto no ocurra, lo cual contradice los resultados obtenidos por Thanos Halazonetis (Huyen *et al.*, 2004), nos está indicando que dicha interacción de por sí no es la responsable de la formación de focos de 53BP1.

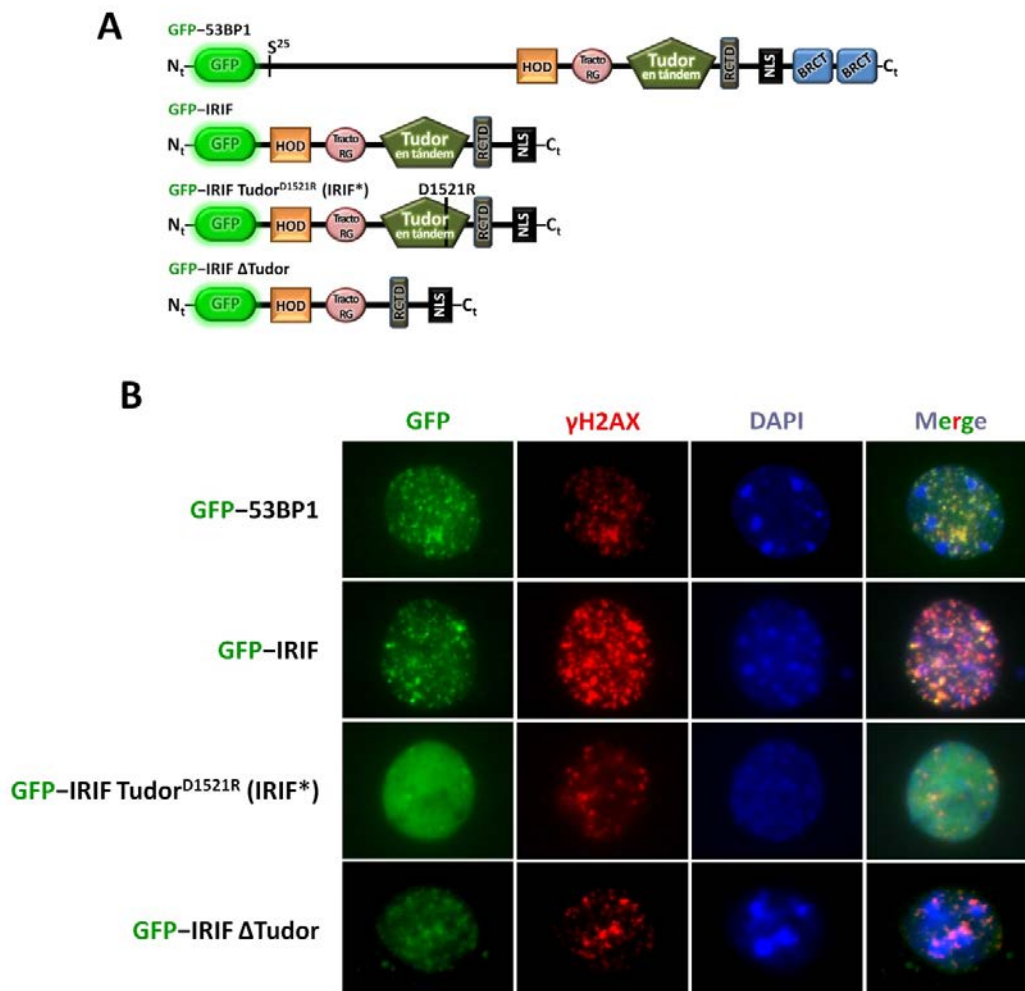


**Figura 18 | El dominio Tudor de 53BP1 no forma focos.** (A) Esquema de la proteína de fusión GFP-Tudor, destinado para su comparación con el resto de proteínas quiméricas generadas (ver siguientes figuras). (B) Ensayo de formación de focos para GFP-Tudor. El plásmido portador de la construcción génica se transfectó en células 3T3. 48 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy y se fijaron tras 15 min. Se tiñeron para 53BP1 (rojo) y con DAPI (azul), para la detección de los núcleos. A pesar de detectarse los focos de 53BP1, GFP-Tudor (verde) en ningún caso los formó.

### 1.4. Los focos de 53BP1 se forman, pero son ineficientes, en ausencia de su dominio Tudor

Dado que el dominio Tudor demostró no ser crítico para el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs, se procedió a estudiar la formación de focos de 53BP1 en su ausencia. Para ello, se usó como modelo de estudio la región mínima formadora de focos de 53BP1 (IRIF, residuos 1220-1703, 484 aminoácidos en total), para mayor comodidad dado el gran tamaño de 53BP1 entera (1972 aminoácidos). Se generaron proteínas quiméricas de fusión con GFP (Figura 19A) de la región IRIF wt, GFP-IRIF y

GFP-53BP1 (esta última como control para demostrar la equivalencia a nivel de focos entre la región IRIF y la proteína completa); y de dos mutantes de ésta que afectan a su dominio Tudor en tándem, GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor y el mutante puntual GFP-IRIF<sup>D1521R</sup> (GFP-IRIF\*), del que previamente se había descrito que eliminada por completo la funcionalidad del dominio Tudor (Huyen *et al.*, 2004). Las construcciones génicas se transfectaron en iMEFs 53BP1 KO, para evitar posibles efectos de oligomerización con la proteína endógena, ya que las quiméricas conservan el dominio HOD (de oligomerización) de la región IRIF. Tras someter las células a irradiación, se analizaron los focos formados por las diferentes proteínas, comparándolos con los de  $\gamma$ H2AX como marcador de DSBs (Figura 19B). Para GFP-53BP1 y GFP-IRIF se obtuvieron focos normales y equivalentes, prácticamente tantos como focos de  $\gamma$ H2AX. Por su parte, los mutantes GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor y GFP-IRIF\*, aunque fueron capaces de formar focos colocalizantes con  $\gamma$ H2AX, éstos resultaron ser ineficientes (más pequeños, en menor número, de generación más lenta), en cierto modo equivalentes a los obtenidos en células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>.



**Figura 19 | Formación de focos en ausencia del dominio Tudor. (A)** Esquema de las proteínas de fusión generadas. **(B)** Ensayo de formación de focos para dichas proteínas (verde). Se electroporaron en iMEFs 53BP1 KO. 24 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy y se fijaron tras 15 min. Se tiñó para  $\gamma$ H2AX (rojo, marcador de DSBs) y con DAPI (azul, núcleos). Los mutantes GFP-IRIF\* y GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor forman focos de manera ineficiente comparados con los controles positivos GFP-IRIF y GFP-53BP1.



Por tanto, estos resultados nos indicaron que, realmente, el dominio Tudor de 53BP1 no es esencial para la formación de focos, aunque sí para que ésta se lleve a cabo de forma eficiente, del mismo modo que ocurre con la marca H4K20me<sub>2</sub>, algo lógico teniendo en cuenta que ésta es reconocida por dicho dominio. Cabe resaltar que, de nuevo, esto representa una inconsistencia con el *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1, según el cual ésta se vería totalmente imposibilitada en ausencia del dominio Tudor.

### 1.5. Diferente dinámica de unión de 53BP1 en la cromatina a en los focos

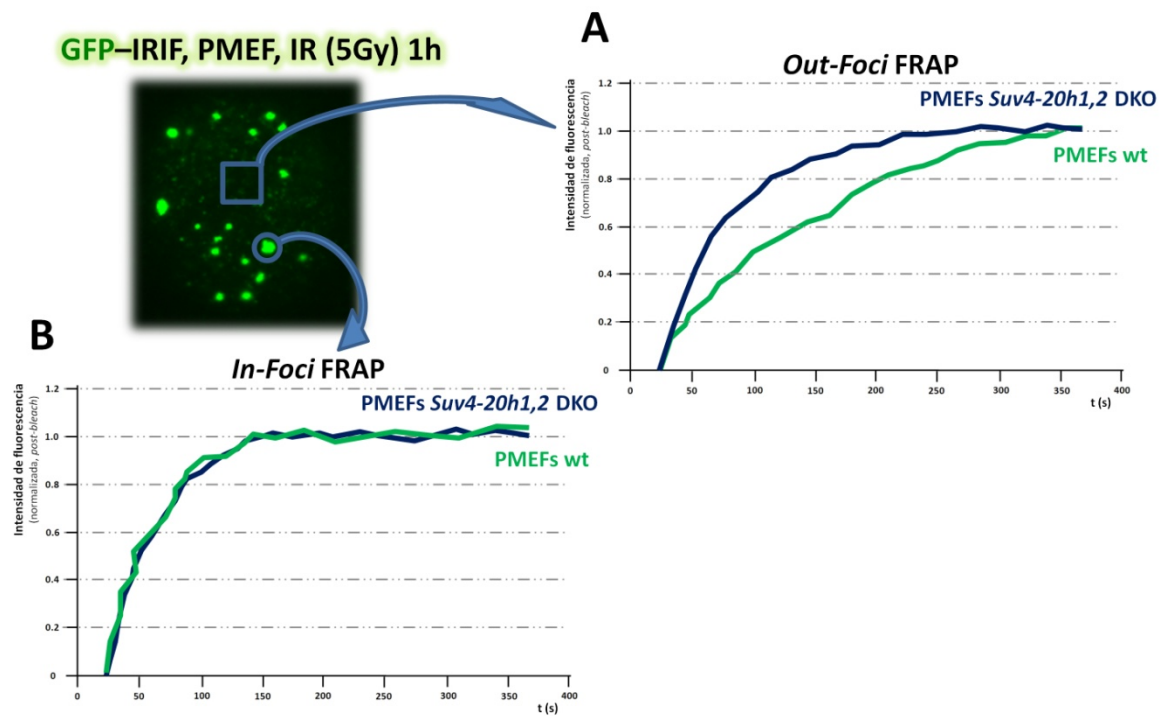
Los resultados obtenidos hasta este punto parecían indicar que 53BP1 está sometida a dos procesos de unión independientes. Uno de ellos, llevado a cabo por la interacción entre su dominio Tudor y la marca H4K20me<sub>2</sub>, sería el responsable de mantener a la proteína constitutivamente unida a la cromatina aun en ausencia de daño en el ADN. El otro, independiente del anterior, vendría dado por la unión de 53BP1 a las DSBs, que se manifiesta en la formación de focos ante daño en el ADN.

Para verificar si, efectivamente, existen dos procesos de unión independientes que, por tanto, muy probablemente seguirían dinámicas diferentes, se optó por tratar de analizar ambas uniones de la proteína mediante FRAP. Éste se llevó a cabo para la proteína GFP–IRIF (equivalente a 53BP1 a nivel de reclutamiento focal) a tiempo tardío (1 h) tras irradiación en PMEFs wt comparados con PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistos de H4K20me<sub>2</sub>. Para ambas líneas, se escogieron células con focos de GFP–IRIF. En cada una de ellas, se efectuó un primer FRAP en una ROI (región de interés, *region of interest*) situada fuera de los focos (*out-foci* FRAP) (Figura 20A), obteniéndose similares resultados a en el FRAP de GFP–53BP1 en las mismas células: Cinética de FRAP más lenta, indicativa de mayor afinidad por la cromatina, en células wt; y cinética de FRAP más rápida, resultado de menor afinidad por la cromatina, en las células *Suv4-20h1,2* DKO. El segundo FRAP se realizó usando una ROI puntual, de tamaño mínimo, localizada dentro de un foco (*in-foci* FRAP) (Figura 20B). La cinética obtenida fue idéntica en ambas líneas celulares y característicamente rápida, incluso más que la del *out-foci* FRAP en PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO.

Así pues, la detección de cinéticas de FRAP de GFP–IRIF diferentes tanto fuera como dentro de los focos indica que las interacciones que mantienen a 53BP1 en la cromatina fuera de los focos son distintas e independientes de las responsables de reclutarla a las DSBs. En el primer caso, dependerían de H4K20me<sub>2</sub>, dadas las diferencias en esta cinética observadas en células wt respecto a las *Suv4-20h1,2* DKO, sin H4K20me<sub>2</sub>. En el segundo caso, las interacciones responsables del reclutamiento focal de 53BP1 serían independientes de H4K20me<sub>2</sub>, ya que no existen diferencias en esa cinética de FRAP entre células wt y *Suv4-20h1,2* DKO.

Una cuestión interesante sería razonar por qué 53BP1 sigue una cinética de FRAP más rápida en los focos. Este hecho podría explicarse considerando que, tras apagar la fluorescencia, la recuperación

se produce por la movilización no de la proteína que ya está reclutada en el foco, sino de la que está circundante en la cromatina o en el nucleoplasma, esto es, en un compartimento diferente. El paso de esta localización al foco supondría pasar a un punto donde la afinidad de la unión es mucho mayor, por lo que la transferencia de la proteína a esta localización se llevaría a cabo de forma mucho más rápida, y sin diferencias entre células wt y desprovistas de H4K20me<sub>2</sub> debido a que el nuevo compartimento, el foco, ya está formado.



**Figura 20 | Dinámicas de FRAP de GFP-IRIF fuera de los focos y dentro de éstos.** PMEFs wt y *Suv4-20h1,2* DKO se electroporaron con el plásmido codificante de GFP-IRIF. 24 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy. Tras 1 h, las células que presentaban focos se sometieron a dos análisis por FRAP en la misma célula. **(A)** FRAP fuera de los focos (*out-foci*), mostrando las diferencias características de afinidad de la proteína por la cromatina en ambas líneas celulares. **(B)** FRAP dentro de los focos (*in-foci*), sin diferencias entre ambas líneas celulares y siguiendo una cinética diferente al anterior. Esto revela la existencia de procesos de unión diferentes para la proteína en los focos y fuera de éstos. Las gráficas se construyeron con valores medios de fluorescencia tras el fotoblanqueo de al menos 5 experimentos independientes, normalizados respecto a los valores antes del fotoblanqueo.

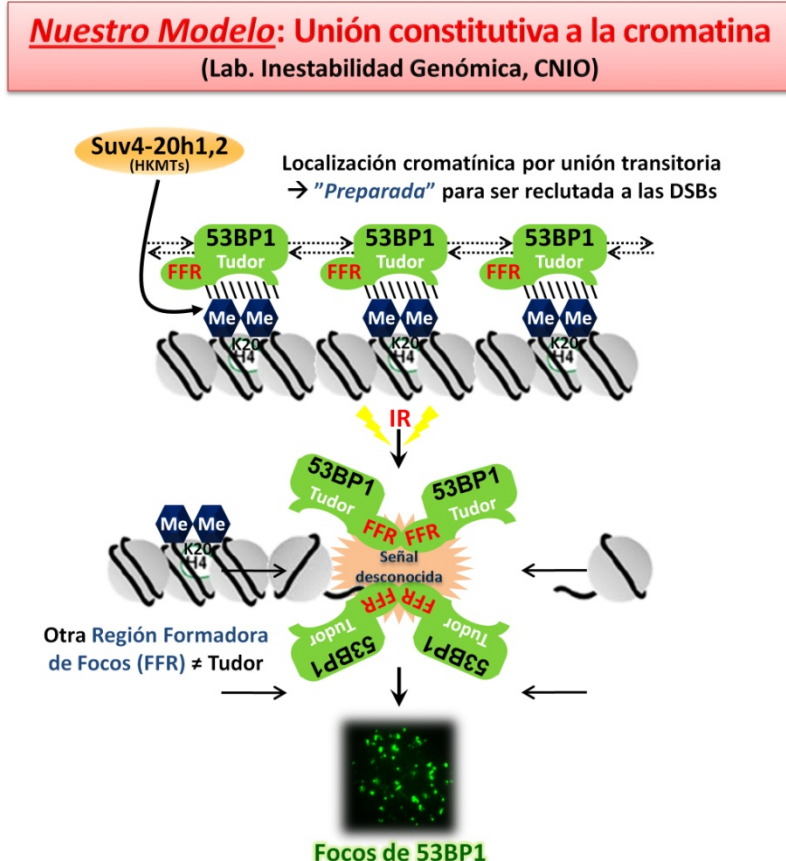
## 1.6. Proposición de un nuevo modelo de formación de focos de 53BP1

Los resultados experimentales obtenidos en la revisión del *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1 suponen inconsistencias con respecto a éste, por lo que obligaron en cierto modo a la elaboración de un nuevo modelo acorde con las observaciones realizadas. *Nuestro modelo* de formación de focos de 53BP1 (Figura 21) se basa en la unión constitutiva de la proteína a la cromatina. En virtud a él, 53BP1 estaría siempre interaccionando con la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>, previamente depositada por todo el genoma gracias a las histona metiltransferasas Suv4-20h1 y h2, a través de su dominio Tudor en tándem, aun sin daño en el ADN, de forma constitutiva. Esta unión se



basaría en interacciones débiles, de naturaleza transitoria, pero continuas, localizadas a lo largo de todo el genoma, de forma que 53BP1 se mantiene inespecíficamente unida a la cromatina de una forma “pegajosa”, “danzando” sobre ella. De este modo, 53BP1 se mantendría en un estado “preparado” para actuar y ser reclutada más eficientemente a las DSBs del ADN. Cuando éstas tienen lugar, por ejemplo por irradiación, la proteína se reclutaría a ellas a través de la interacción de otra región formadora de focos (FFR, *foci-forming region*) aún no identificada con una señal localizada en las DSBs todavía desconocida. Es entonces cuando tiene lugar la relocalización de 53BP1 para formar los focos.

Resulta esencial destacar que la diferencia fundamental con el *modelo clásico* radica en que este último propone una unión directa de 53BP1 a las DSBs vía interacción Tudor–H4K20me<sub>2</sub> sólo en condiciones de daño en el ADN, cuando la marca quedaría expuesta para su reconocimiento. Por el contrario, según *nuestro modelo*, esta interacción siempre estaría teniendo lugar a lo largo de todo el genoma, pero su función no sería la de reclutar a 53BP1 a las DSBs, sino la de mantenerla en una localización cromatínica para que pueda llevar a cabo su función más eficientemente. El reclutamiento a las DSBs sería otro evento independiente, llevado a cabo por la región FFR antes mencionada.



**Figura 21 | Nuestro modelo de formación de focos de 53BP1.** La proteína estaría siempre uniéndose a H4K20me<sub>2</sub> a través de su dominio Tudor en tándem, incluso en ausencia de daño en el ADN, lo que la mantendría constitutivamente en la cromatina, “preparada” para reclutarse a las DSBs cuando tengan lugar. Esto último ocurriría por una unión diferente, a través de la interacción de otra presunta región formadora de focos (FFR, *foci-forming region*) con una señal aún desconocida de las DSBs.

Por otra parte, la función del dominio Tudor de 53BP1 sería la de posibilitar tal localización cromatínica, siendo prescindible para la formación de focos, ya que la función reparadora sería ejecutada por otros dominios diferentes de la proteína, pero asegurando que el proceso se lleve a cabo

de manera rápida y eficiente. Más aún, muy posiblemente, esta función adhesiva de cromatina podría extenderse a otros dominios funcionalmente equivalentes en otras proteínas de la DDR.

Este nuevo modelo se convierte desde este momento en nuestra hipótesis de trabajo, la cual tratará de verificarse en el sucesivo desarrollo de la investigación.

## **2. Verificación de *nuestro modelo* de formación de focos de 53BP1**

### **2.1. Estrategia de verificación**

El modelo propuesto para la formación de focos de 53BP1 se basa en el principio de que el dominio Tudor de esta proteína no resulta esencial para su reclutamiento a las DSBs, sino que tan sólo desempeña una función general de adhesión a la cromatina. Su eliminación sigue generando focos, aunque de forma ineficiente. Por tanto, este dominio podría ser sustituido por cualquier otro con una función similar.

Así pues, para la verificación de nuestro modelo se optó por una estrategia de “recuperación de dominios” a nivel funcional, la cual se esquematiza en la Figura 22. Básicamente, se basa en el principio de que el intercambio del dominio Tudor en tándem de 53BP1 por otros dominios de unión a cromatina no relacionados con la DDR recuperaría las propiedades de formación de focos y de afinidad por la cromatina de la proteína, en la medida en que dichos dominios serían funcionalmente equivalentes.

En concreto, para esta estrategia de verificación de nuestro modelo se generaron proteínas quiméricas fusionadas a GFP, a fin de detectarlas por inmunofluorescencia. Se optó por la generación de fusiones de dominios candidato de unión genérica a cromatina al extremo C-terminal del mutante puntual IRIF<sup>D1521R</sup> (IRIF\*), que, como hemos descrito, forma focos de manera ineficiente debido a la inactivación de su dominio Tudor. Las proteínas quiméricas generadas se analizaron funcionalmente en células 53BP1 KO (para evitar oligomerización con la proteína endógena, ya que conservan el dominio HOD de oligomerización) en cuanto a su afinidad por la cromatina (por FRAP y fraccionamiento bioquímico) y capacidad de formación de focos (reclutamiento a las DSBs), esperando recuperar las propiedades de la versión wt de la proteína. En un principio se pensó en un abordaje de intercambio de dominios (*domain swapping*) entre Tudor y los dominios de unión a cromatina usando el mutante IRIF  $\Delta$ Tudor, pero las proteínas generadas parecen alterarse por completo funcionalmente, posiblemente debido a alteraciones en el plegamiento de la región IRIF, ya que en ningún caso generaron focos, ni siquiera ineficientes. Por ello, finalmente se optó por la generación de proteínas quiméricas por simple adición C-terminal de dominios al mutante puntual.

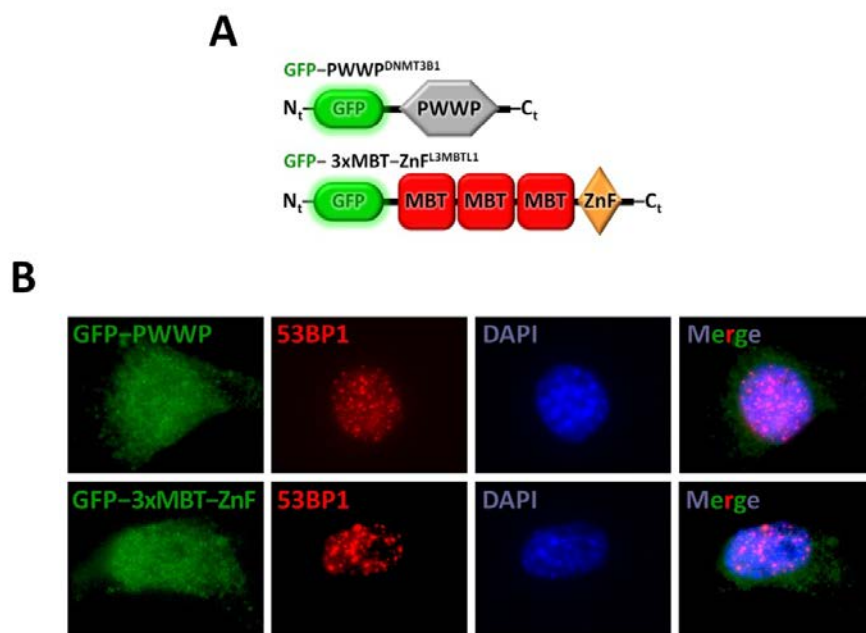


**Figura 22 | Estrategia de verificación de nuestro modelo de formación de focos de 53BP1.** El dominio Tudor de 53BP1 se encarga de mantener a la proteína unida a la cromatina de forma constitutiva por interacción con la marca H4K20me<sub>2</sub>, mientras que otra presunta región formadora de focos (FFR, *foci-forming region*) sería la responsable del reclutamiento a las DSBs. La inactivación de Tudor por delección o por mutación puntual crítica (D1521R) ocasionaría la pérdida de la interacción con H4K20me<sub>2</sub> y, por consiguiente, de la afinidad por la cromatina, unión que se recuperaría con otros dominios de unión genérica a la cromatina fusionados a la proteína mutante, en un fenómeno de recuperación funcional de dominios.

## 2.2. Ciertos dominios de unión a histonas metiladas rescatan parcialmente la función de Tudor en la formación de focos de 53BP1

Como primeros dominios candidato de unión genérica a cromatina para la verificación de nuestro modelo, se utilizaron ciertos dominios de unión a metilaciones de histonas, de la familia Royal, al igual que Tudor. Por una parte, el dominio PWWP, de función aún desconocida en el momento de inicio de este estudio, pero de presencia bastante extendida en proteínas relacionadas con la cromatina, se tomó de la proteína DNMT3B1 humana (residuos 223-281), una ADN metiltransferasa *de novo* no implicada en la DDR y que no es reclutada a las DSBs. La existencia del síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anomalías faciales) asociado a mutaciones en el dominio PWWP de DNMT3B (OMIM #242860) apoya nuestra hipótesis de que este dominio podría asegurar que la función de la proteína se lleve a cabo eficientemente, al igual que Tudor en 53BP1. Posteriormente, se describió que los dominios PWWP se unen a H4K20me (Wang *et al.*, 2009). Otro dominio utilizado fue MBT, en concreto las tres repeticiones MBT en tándem seguidas del dedo de zinc (3xMBT-ZnF) presentes en la proteína L3MBTL1 humana (residuos 206-581), un compactador de cromatina (Trojer *et al.*, 2007) no reclutado a las DSBs, a pesar de haberse descrito que estas repeticiones MBT también reconocen H4K20me (Trojer *et al.*, 2007).

Con estos dominios, se generaron en primer lugar las proteínas de fusión GFP-PWWP y GFP-3xMBT-ZnF (Figura 23A). Las construcciones se transfectaron en células HeLa y se comprobó que, de acuerdo con nuestras predicciones, no fueron capaces de formar focos inducidos por radiación ionizante (Figura 23B). Este dato constituye el control necesario para aplicar nuestra estrategia de recuperación funcional de dominios.

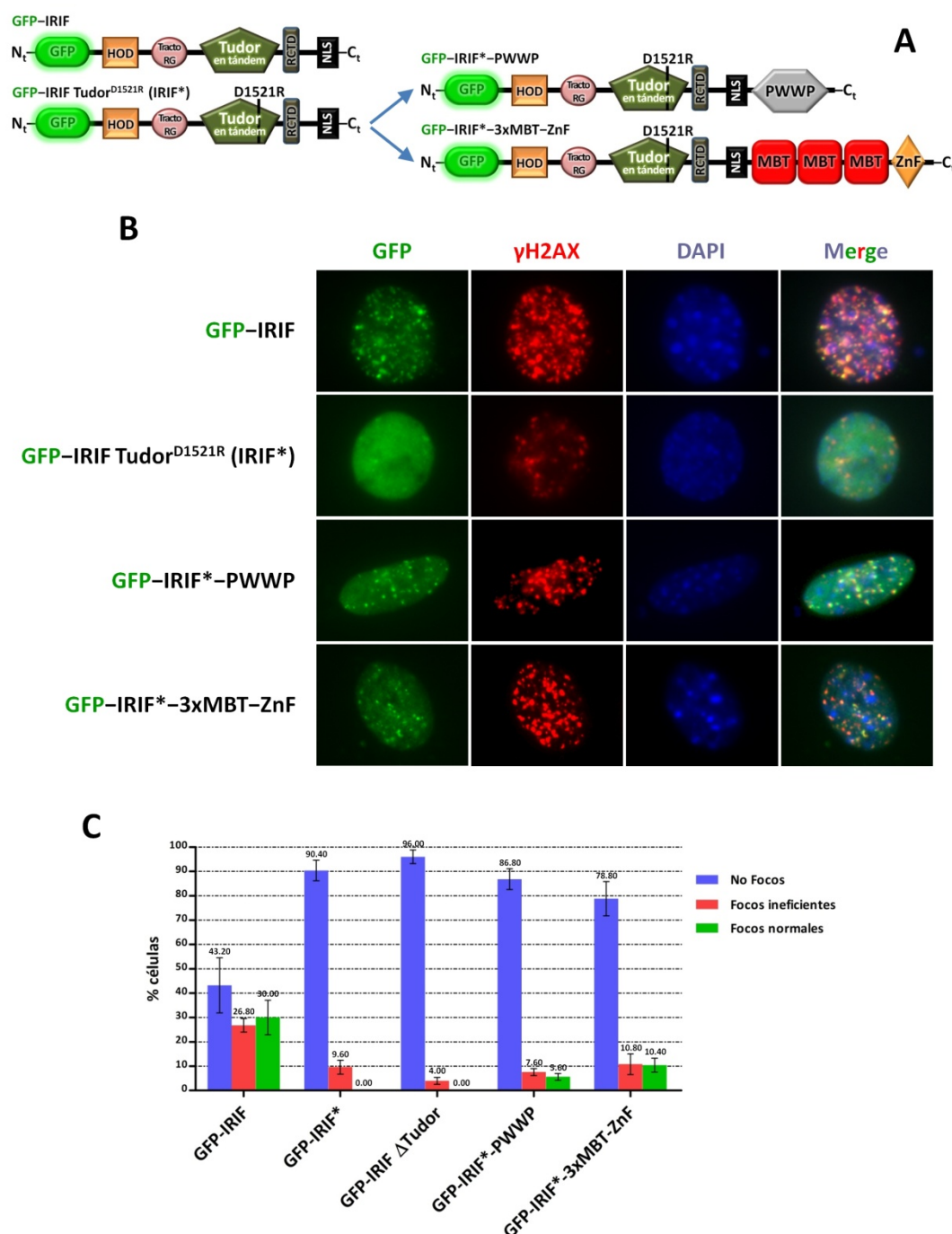


**Figura 23 | Los dominios PWWP de DNMT3B1 y 3xMBT-ZnF de L3MBTL1 no forman focos. (A)** Esquema de las proteínas de fusión generadas. **(B)** Ensayo de formación de focos para GFP-PWWP y GFP-3xMBT-ZnF. Se transfectaron células 3T3. 48 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy y se fijaron tras 15 min. Se tiñeron para 53BP1 (rojo) y con DAPI (azul), para la detección de los núcleos. A pesar de detectarse los focos de 53BP1, estas proteínas (verde) en ningún caso los formaron.

Seguidamente, se obtuvieron las construcciones génicas GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF (Figura 24A), para aplicar la recuperación de dominios. Transfectadas en iMEFs 53BP1 KO, ambas recuperaron la formación de focos inducidos por radiación ionizante a niveles mucho mayores que en el control negativo GFP-IRIF\* (focos ineficientes) y, en algunos casos, comparables a los del control positivo GFP-IRIF (focos normales) (Figura 24B).

Sin embargo, conviene advertir que esta recuperación de focos no resultó total, sino únicamente parcial. Esto se comprobó al cuantificar la formación de focos (Figura 24C). Se hizo un recuento estadístico clasificando los focos en tres categorías: Sin formación de focos, focos ineficientes y focos normales. Se obtuvieron los porcentajes de cada categoría para cada una de las proteínas quiméricas. En el caso del control positivo GFP-IRIF, un 30% de las células presentaron focos normales, el 26.8% focos ineficientes y un 43.2% de ellas no mostraron focos. En comparación, los controles negativos GFP-IRIF\* y GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor no presentaron en ningún caso focos normales y sólo se apreció formación de focos ineficientes en el 9.6% y el 4% de las células, respectivamente. En las proteínas de recuperación GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF los focos normales pasaron a recuperarse en el 5.6% y el 10.4% de las células, respectivamente, con formación de focos ineficientes en el 7.6% y el 10.8%, respectivamente. Aunque se trata de un rescate parcial, no deja de ser un efecto

bastante notable sobre la pérdida de eficiencia de los mutantes Tudor, que, por tanto, verifica nuestra hipótesis sobre la equivalencia funcional entre dominios.



**Figura 24 | Rescate parcial de la formación de focos con dominios de unión a histonas metiladas. (A)** Esquema de las proteínas de fusión generadas. **(B)** Ensayo de formación de focos para dichas proteínas (verde). Se electroporaron en iMEFs 53BP1 KO. 24 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy y se fijaron tras 15 min. Se tiñó para γH2AX (rojo, marcador de DSBs) y con DAPI (azul, núcleos). GFP-IRIF se tomó como control positivo (focos normales) y GFP-IRIF\* como control negativo (focos ineficientes). GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF rescataron la formación de focos normales. **(C)** Cuantificación de la formación de focos por las proteínas quiméricas. Se incluye también GFP-IRIF ΔTudor, para mostrar su equivalencia a GFP-IRIF\*. Las barras representan el porcentaje de células con cada categoría de focos, en forma de medias ± desviaciones típicas de 3 réplicas independientes en cada una de las cuales se analizaron 250 núcleos. Puede apreciarse que el efecto de rescate de los focos es únicamente parcial.

### 2.3. Ciertos dominios de unión a histonas metiladas mantienen a 53BP1 unida constitutivamente a la cromatina

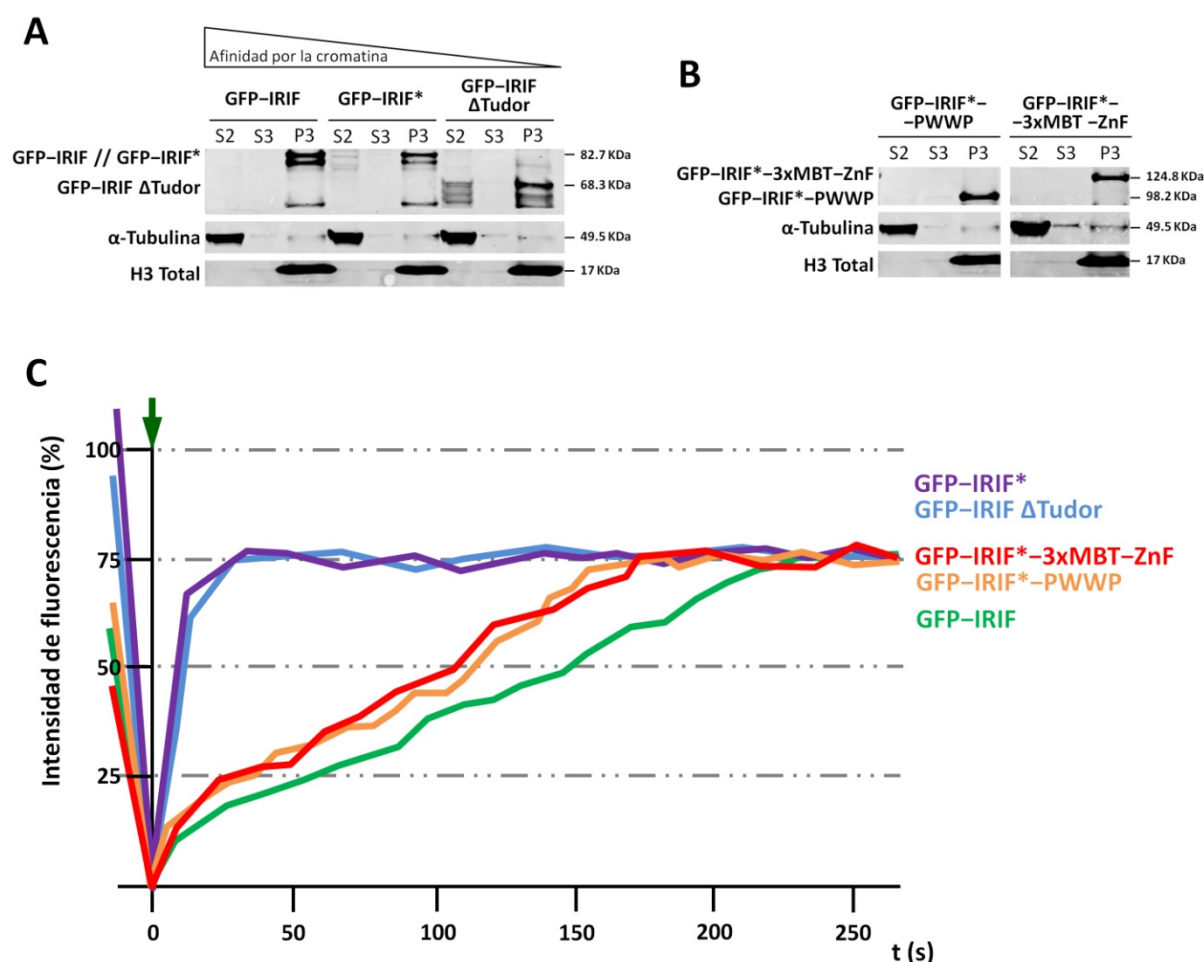
Siguiendo con nuestra estrategia de recuperación funcional de dominios con los dominios de unión a histonas metiladas PWWP y 3xMBT-ZnF, el siguiente paso fue comprobar si éstos son capaces de localizar también a 53BP1 en la cromatina, de modo análogo a lo que ocurre con Tudor en su interacción con H4K20me<sub>2</sub>. Para ello, un primer abordaje consistió en la transfección de las construcciones GFP-IRIF, GFP-IRIF\*, GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor, GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF en células HeLa sin irradiar, con posterior estudio de su localización cromatínica mediante fraccionamiento bioquímico seguido de *Western blot*. La proteína GFP-IRIF mostró una localización casi exclusivamente cromatínica (fracción P3) (Figura 25A), del mismo modo que 53BP1 completa. Esta afinidad por la cromatina se perdió en cierta medida al eliminar el dominio Tudor, ya que cierta cantidad de las proteínas mutantes GFP-IRIF\* y, en mayor medida, GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor pasó a las fracciones solubles (S3 y S2) (Figura 25A). Este resultado permite relacionar la localización cromatínica constitutiva de 53BP1 con el dominio Tudor. Por su parte, las proteínas GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF recuperaron la localización exclusivamente cromatínica de GFP-IRIF (Figura 25B), lo cual permite concluir que los dominios PWWP y 3xMBT-ZnF también son capaces de mantener a 53BP1 constitutivamente unida a la cromatina del mismo modo que Tudor, con el cual serían funcionalmente equivalentes.

No obstante, conviene considerar estos resultados con precaución, ya que, a pesar de que el experimento se realizó sin irradiación y por tanto no hay formación de focos, sí son posibles los efectos de oligomerización entre las diferentes proteínas transfectadas y la propia 53BP1 endógena, pues todas ellas conservan el dominio HOD de oligomerización y ésta podría ocurrir incluso en condiciones de no formación de focos. Por otra parte, la fracción de proteínas que perdió afinidad por la cromatina se observó mayoritariamente en la fracción S2 (citoplasmática) en lugar de en la S3 (nucleoplasmática), aunque esto podría deberse al menor contenido proteico de esta última.

Por ello, más interesantes si cabe resultan los resultados obtenidos al analizar por FRAP la dinámica de unión a la cromatina de estas proteínas transfectadas en iMEFs 53BP1 KO (Figura 25B). En este caso, pudo apreciarse claramente la mayor afinidad de GFP-IRIF por la cromatina, puesta de manifiesto por su cinética de FRAP más lenta. Esta afinidad se perdió en los mutantes del dominio Tudor, ya que las proteínas GFP-IRIF  $\Delta$ Tudor y GFP-IRIF\* pasaron a mostrar una cinética de FRAP mucho más rápida y en ambos casos equivalente. Sin embargo, la afinidad por la cromatina se recuperó en gran medida en las fusiones con los dominios adhesivos, ya que las proteínas GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF pasaron a mostrar una cinética de FRAP lenta, casi comparable a la de la proteína wt, especialmente en el caso de GFP-IRIF\*-PWWP.



De conjunto, estos análisis permitieron concluir que tanto Tudor como otros dominios de unión a histonas metiladas mantienen a sus proteínas localizadas en la cromatina, siendo funcionalmente equivalentes e intercambiables entre sí. En combinación con los resultados del apartado anterior, se infirió que es precisamente esta localización cromatínica debida a estos dominios la que permite que los focos de 53BP1 se formen de manera eficiente, ya que al perder la afinidad por la cromatina los focos son ineficientes, pero al recuperarla éstos se forman con relativa normalidad.



**Figura 25 | Rescate de la localización cromatínica con dominios de unión a histonas metiladas.** (A) Fraccionamiento bioquímico de cromatina y *Western blot* mostrando la pérdida progresiva de afinidad por la cromatina de la región IRIF de 53BP1 con la eliminación de su dominio Tudor en tándem por mutación puntual y por delección. Las construcciones génicas GFP-IRIF, GFP-IRIF\* y GFP-IRIF ΔTudor se cotransfectaron en células HeLa. 48 h después, se realizó fraccionamiento bioquímico de cromatina. Las diferentes fracciones proteicas (S2 = Fracción citosólica; S3 = Fracción nucleoplásmica; P3 = Fracción cromatínica/matriz nuclear) se separaron por *Western blot*. Las proteínas de fusión se detectaron con un anticuerpo anti-GFP. La histona H3 total se usó como control de carga de la fracción cromatínica y la α-Tubulina como el de la fracción citosólica. (B) Fraccionamiento bioquímico de cromatina y *Western blot* con las proteínas quiméricas GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF. La afinidad por la cromatina se recupera con los dominios PWWP o 3xMBT-ZnF. (C) Cinéticas de FRAP de las diferentes proteínas quiméricas. Se electroporaron en iMEFs 53BP1 KO y se analizaron 24 h después. Las gráficas muestran porcentajes totales de intensidad de fluorescencia respecto a antes del fotoblanqueo, representadas como medias de al menos 5 experimentos independientes. La flecha indica el momento del fotoblanqueo (t = 0). Los resultados obtenidos corroboraron los datos del fraccionamiento bioquímico, con cinéticas de FRAP rápidas (baja afinidad por la cromatina) para GFP-IRIF ΔTudor y GFP-IRIF\*, y lentas (alta afinidad por la cromatina) para GFP-IRIF, GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF.

## 2.4. Otros dominios de unión inespecífica a cromatina no rescatan la formación de focos de 53BP1

El siguiente paso en la estrategia de verificación de nuestro modelo consistió en el análisis de la recuperación de los fenotipos de formación de focos y de unión a la cromatina por otros dominios de naturaleza más diversa y pobremente descritos, que no reconocen modificaciones de histonas, los cuales se consideraron como candidatos a actuar como dominios de unión genérica e inespecífica a cromatina. Así, se generaron proteínas de fusión de recuperación de dominios análogas a las de PWWP y 3xMBT–ZnF, pero fusionando estos nuevos dominios. Las diferentes construcciones génicas GFP–IRIF\*–Dominio se transfectaron en iMEFs 53BP1 KO y seguidamente se analizaron sus propiedades de formación de focos inducidos por radiación ionizante. Los resultados se recogen en la Figura 26A, acompañados de su cuantificación en la Figura 26B, en la que se comparan con el control positivo GFP–IRIF y el control negativo GFP–IRIF\*. Los dominios utilizados y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- **H15:** Dominio característico de las familias de histonas *linker* H1 y H5 (en aves), al que se le asigna una función de unión inespecífica al ADN internucleosómico (código de acceso en SMART: SM00526). Tomado de la histona H1.2 humana (residuos 34-99). La proteína GFP–IRIF\*–H15 recupera en pequeña medida los focos, siendo normales en el 3.2% de las células, e ineficientes en el 12%, algo por debajo del rescate obtenido con GFP–IRIF\*–PWWP (Figuras 24B y 24C).
- **3xAT–Hook:** Motivos de unión al ADN con preferencia por regiones ricas en A/T, característicos de las proteínas del grupo de alta movilidad (HMG, *high mobility group*) (SM00384). Se tomaron las tres repeticiones AT–Hook en tándem de la proteína HMGA1 humana (residuos 23-93). La proteína GFP–IRIF\*–3xAT–Hook sólo formó focos ineficientes y en un porcentaje de células (2%) menor incluso que GFP–IRIF\*. Se observó además que la proteína tiende a acumularse en focos heterocromáticos, que no colocalizan con los de  $\gamma$ H2AX pero sí con los cromocentros característicos observables al DAPI en los núcleos de células de ratón. Así pues, el dominio AT–Hook no sería un buen candidato como dominio de unión inespecífica a la cromatina, ya que dirige a la proteína hacia localizaciones específicas, desde las que vería impedida su movilización a las DSBs, lo que explica por qué se obtienen menos focos que con los mutantes Tudor.
- **HhH1:** Dominio hélice-horquilla-hélice (*helix-hairpin-helix*) presente en proteínas de unión al ADN inespecífica de secuencia (SM00278). Tomado de la ADN Polimerasa  $\lambda$  (POL $\lambda$ ) humana (residuos 22-41), una polimerasa de síntesis translesión que, por tanto, interviene en la DDR. La proteína GFP–IRIF\*–HhH1 no presentó diferencias significativas en cuanto a



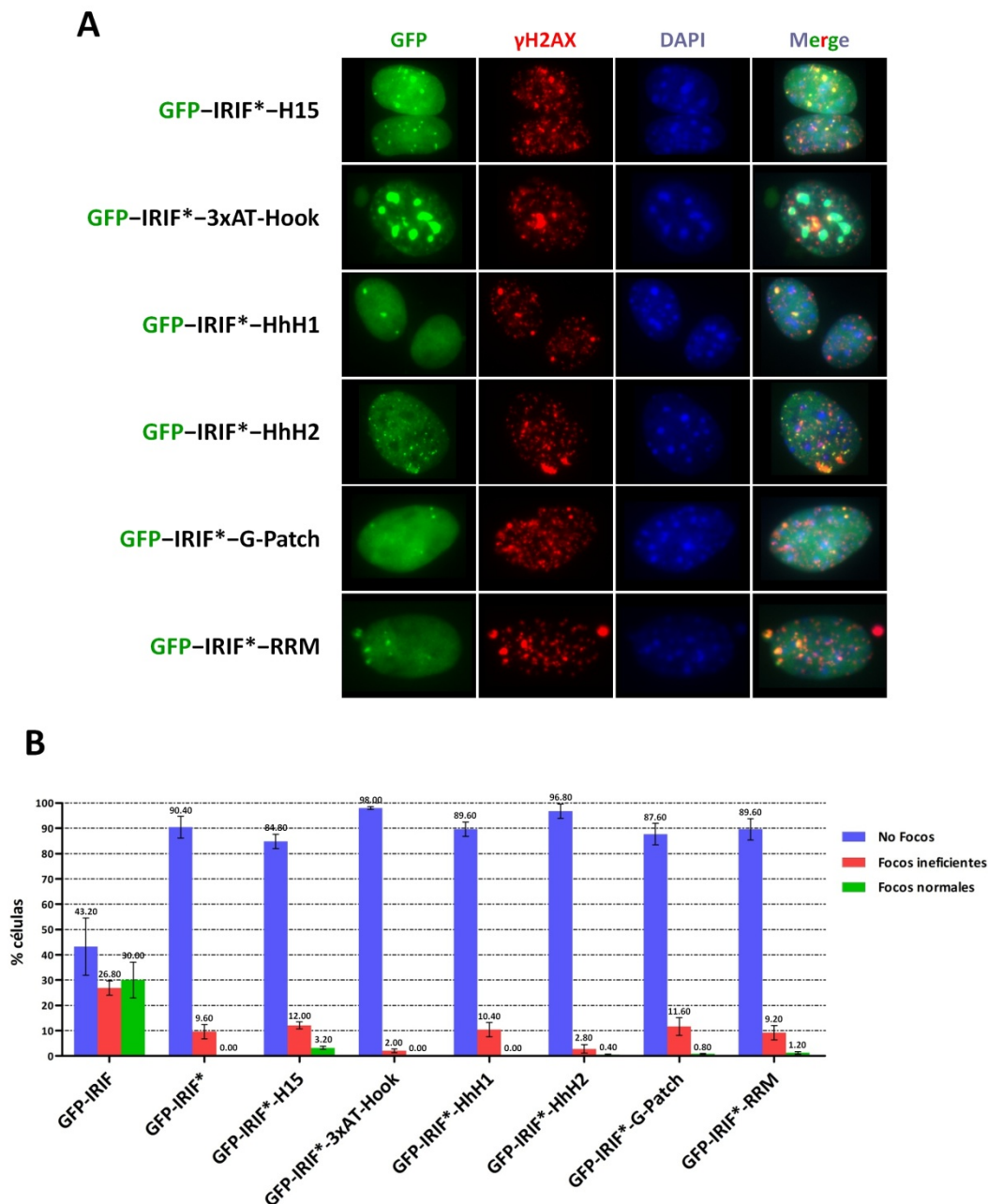
formación de focos respecto a GFP-IRIF\*. Sólo se observaron focos ineficientes en el 10.4% de las células, por lo que no rescató este fenotipo.

- **HhH2:** Al igual que en el caso anterior, otro dominio hélice-horquilla-hélice (*helix-hairpin-helix*) presente en proteínas de unión al ADN inespecífica de secuencia (SM00279). Tomado de la Exonucleasa 1 (EXO1) humana (residuos 212-245), que, por tanto, participa en la DDR. La proteína GFP-IRIF\*-HhH2 rescató los focos normales en un minúsculo porcentaje de células (0.4%), pero también se obtuvieron menos con focos ineficientes (2.8%) y más sin focos con respecto a GFP-IRIF\*. Por tanto, no puede considerarse que rescate el fenotipo de formación de focos.
- **G-Patch:** Dominio que aparece en presuntas proteínas de unión a ARN, por lo que se cree que podría desempeñar esta función (SM00443). En nuestro caso, su interés radica en que podría unirse de forma inespecífica al componente de ARN presente en la cromatina. Se obtuvo de la proteína RBM10 humana (residuos 856-902). la proteína GFP-IRIF\*-G-Patch formó focos ineficientes (11.6% de las células) de forma similar a GFP-IRIF\*, si bien se obtuvo un reducido porcentaje de células con focos normales (0.8%). Estos datos tampoco se podrían considerar un rescate del fenotipo, o, en caso de serlo, sería mínimo.
- **RRM:** Motivo de reconocimiento de ARN (*RNA-recognition motif*), un dominio presente en proteínas de unión a ARN de cadena sencilla, a veces en varias copias, por lo que se le asigna esta función (SM00360). Al igual que en el caso anterior, podría unirse inespecíficamente a componentes de ARN cromatínico. También obtenido de la proteína RBM10 humana (residuos 301-380). La proteína GFP-IRIF\*-RRM formó focos de manera análoga a la anterior. Un porcentaje de células (9.2%) similar a en GFP-IRIF\* formó focos ineficientes, y en un bajo porcentaje (1.2%) se obtuvieron focos normales. En este caso, el rescate fenotípico sería, si acaso, reducido.

En resumen, únicamente con el dominio H15 se obtuvo cierto rescate parcial de la formación de focos de 53BP1, pero aun así es considerablemente menor al obtenido con los dominios PWWP y 3xMBT-ZnF, de unión a histonas metiladas. Los dominios G-Patch y RRM de unión a ARN presentan cierto efecto de rescate, pero resulta mínimo. Los dominios HhH1 y HhH2 no presentaron diferencias apreciables con los mutantes Tudor. Finalmente, el dominio AT-Hook actuó impidiendo la formación de focos por direccionalización de la proteína hacia localizaciones heterocromáticas específicas.

Del análisis efectuado con estos dominios y los anteriores puede concluirse que los dominios de unión inespecífica a cromatina requeridos para una formación eficiente de focos han de ser, preferiblemente, dominios que reconozcan la marca H4K20me<sub>2</sub>, ubicua por todo el genoma. Si esta señal inespecífica de localización cromatínica puede ser sustituida por otra o no, resulta una cuestión

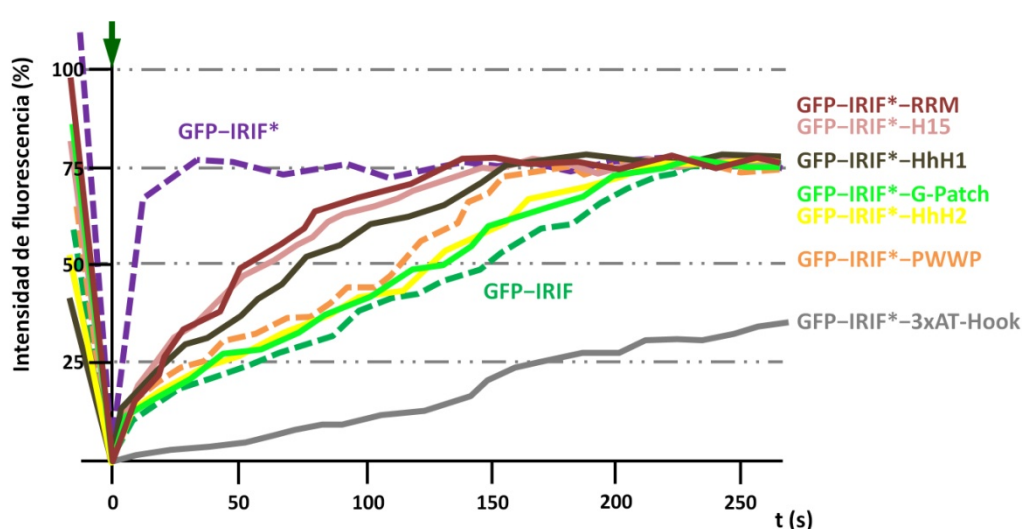
más discutible, ya que al analizar presuntos dominios de adhesión inespecífica a la cromatina pero que no reconocen metilaciones de histonas, únicamente H15 rescató el fenotipo de forma muy reducida.



**Figura 26 | Formación de focos con otros dominios de unión a cromatina. (A)** Ensayo de formación de focos para las proteínas quiméricas GFP-IRIF\*-H15/3xAT-Hook/HhH1/HhH2/G-Patch/RRM (verde), portadoras de presuntos dominios de unión inespecífica a la cromatina. Se electroporaron en iMEFs 53BP1 KO. 24 h después, se irradiaron a una dosis de 5 Gy y se fijaron tras 15 min. Se tiñó para  $\gamma$ H2AX (rojo, marcador de DSBs) y con DAPI (azul, núcleos). Aunque en todos los casos algunas células presentaron focos, no resultaron comparables a los de la proteína wt GFP-IRIF, salvo con el dominio H15 en cierta medida. En el caso de GFP-IRIF\*-3xAT-Hook, puede apreciarse la localización de la proteína en los focos heterocromáticos visibles al DAPI. **(B)** Cuantificación de la formación de focos por las proteínas quiméricas. Se incluyen también el control positivo GFP-IRIF y el control negativo GFP-IRIF\*. Las barras representan el porcentaje de células con cada categoría de focos, en forma de medias  $\pm$  desviaciones típicas de 3 réplicas independientes en cada una de las cuales se analizaron 250 núcleos. No se aprecia efecto de rescate de los focos, a excepción de en GFP-IRIF\*-H15 de forma reducida.

## 2.5. Otros dominios de unión inespecífica a cromatina son capaces de mantener a 53BP1 localizada en ésta

Por último, se trató de verificar que los nuevos dominios considerados en nuestro análisis (H15, 3xAT-*Hook*, HhH1, HhH2, *G-Patch* y RRM) como presuntos dominios de unión inespecífica a cromatina presentan de hecho afinidad por ésta. Para ello, se transfectaron sus construcciones génicas GFP-IRIF\*-Dominio en iMEFs 53BP1 KO y se analizó mediante FRAP la dinámica de unión a la cromatina de cada una de las proteínas quiméricas. Los resultados se muestran en la Figura 27, comparándose las gráficas con las cinéticas de GFP-IRIF (control positivo de afinidad normal por la cromatina), GFP-IRIF\* (control negativo de pérdida de afinidad por la cromatina) y GFP-IRIF\*-PWWP (control de recuperación de afinidad por la cromatina).



**Figura 27 | Rescate de la localización cromatínica con otros dominios de unión inespecífica a cromatina.** Cinéticas de FRAP de las proteínas quiméricas GFP-IRIF\*-H15, GFP-IRIF\*-3xAT-*Hook*, GFP-IRIF\*-HhH1, GFP-IRIF\*-HhH2, GFP-IRIF\*-*G-Patch* y GFP-IRIF\*-RRM, junto a los controles (en línea discontinua) GFP-IRIF\* (baja afinidad por la cromatina), GFP-IRIF (alta) y GFP-IRIF\*-PWWP (recuperación). Se electroporaron en iMEFs 53BP1 KO y se analizaron 24 h después. Las gráficas muestran porcentajes totales de intensidad de fluorescencia respecto a antes del fotoblanqueo, representadas como medias de al menos 5 experimentos independientes. La flecha indica el momento del fotoblanqueo ( $t = 0$ ). En todos los casos se recuperó la afinidad por la cromatina. GFP-IRIF\*-3xAT-*Hook* presenta una cinética de FRAP característica de proteínas fuertemente unidas a la cromatina.

En todos los casos las proteínas analizadas presentaron afinidad por la cromatina, lo que indica que todos estos dominios son capaces de direccionar a sus proteínas a la cromatina, resultado experimental que nunca antes había sido descrito. Un grupo de ellas (en orden de afinidad por la cromatina de sus dominios: RRM < H15 < HhH1) mostraron una afinidad por la cromatina menor que con el dominio PWWP (siendo la de éste a su vez algo menor que la del dominio Tudor en GFP-IRIF), pero bastante mayor que la del mutante Tudor. Dos proteínas (dominios *G-Patch*  $\approx$  HhH2) mostraron una afinidad por la cromatina similar, intermedia entre la de PWWP y Tudor. Por último, la proteína con el dominio 3xAT-*Hook* presentó una afinidad extremadamente alta por la

cromatina, con una cinética de FRAP muy lenta. Esto podría indicar que este dominio localiza a la proteína en la cromatina, pero, a diferencia de los otros dominios, lo hace de forma específica y mediante uniones fuertes, lo cual es consistente con los resultados de inmunofluorescencia, que muestran cómo la proteína se localiza en los focos heterocromáticos. Este hecho no es de extrañar teniendo en cuenta la procedencia del dominio: La proteína HMGA1, un componente integral de la heterocromatina. Recopilando todos los datos (Figuras 25B y 27), el orden de afinidad por la cromatina de todos los dominios analizados se establecería como sigue:

$$\text{Tudor}^*/\Delta\text{Tudor} \ll \text{RRM} < \text{H15} < \text{HhH1} < \text{PWWP} \approx \text{3xMBT-ZnF} < \\ < \text{G-Patch} \approx \text{HhH2} < \text{Tudor} \ll \text{3xAT-Hook}$$

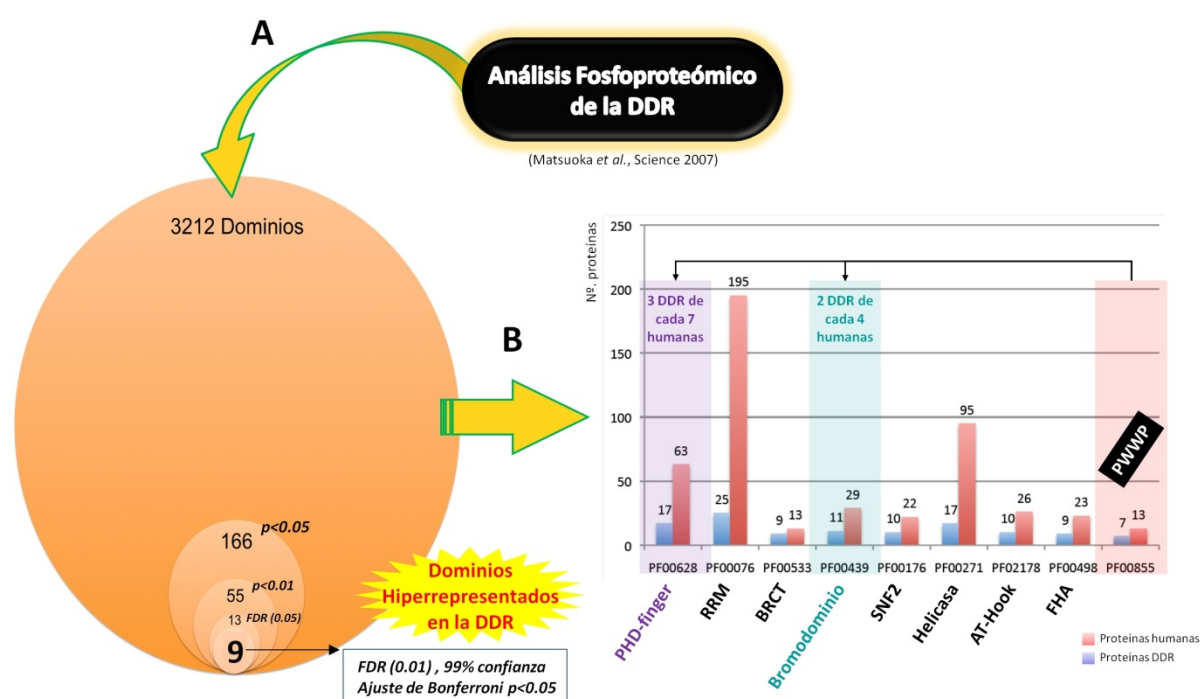
Sin embargo, hay que resaltar que, aunque estos dominios sean de unión a cromatina, como se ha visto en el apartado anterior, la recuperación de los focos de 53BP1 sólo se produce parcialmente en el caso de los dominios de unión a H4K20me (PWWP y 3xMBT-ZnF) y, en menor medida, con el dominio H15 de unión inespecífica al ADN internucleosómico. Es posible que con el resto de dominios la formación de focos no se rescate porque realmente no sean capaces de direccionar a la proteína de forma inespecífica por toda la cromatina (en el caso de 3xAT-Hook), o bien porque la unión a H4K20me<sub>2</sub>, además del papel descrito en nuestro modelo, coopere de forma especial en el reclutamiento a las DSBs.

### 3. Extensión del modelo a otras proteínas y dominios de la DDR: MSH6 y su dominio PWWP

#### 3.1. Análisis bioinformático de dominios hiperrepresentados en la DDR

A fin de desvelar si nuestro modelo podría ser extensible a otras proteínas de la DDR, se llevó a cabo un análisis bioinformático gracias a la colaboración de Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, Instituto de Medicina Predictiva y Personalizada del Cáncer (IMPPC), Badalona). Se partió de un subconjunto de más de 700 proteínas previamente identificadas como sustratos de las PIKKs ante daño en el ADN en un análisis fosfoproteómico de la DDR (Matsuoka *et al.*, 2007) y se analizaron de acuerdo con su composición en dominios. Como resultado, tras aplicar distintos niveles de significancia estadística, se obtuvieron 9 dominios proteicos hiperrepresentados en la DDR en comparación con todo el proteoma humano (Figura 28A). Estos dominios y en cuántas proteínas de la DDR en comparación con todas las proteínas humanas aparecen pueden verse en la Figura 28B. En concreto, estos dominios hiperrepresentados en la DDR fueron: PHD-*finger* (de unión a metilaciones de histonas), RRM (de unión a ARN), BRCT (de unión a fosfopéptidos), Bromodominio (de unión a acetilaciones de histonas), SNF2 (remodelador de cromatina), Helicasa, AT-*Hook* (de unión a regiones ricas en A/T del ADN), FHA (de unión a fosfopéptidos) y PWWP (en principio, de función

desconocida, pero luego se comprobó que se une a H4K20me). De modo interesante, todos ellos son dominios de unión a cromatina o íntimamente relacionados con procesos que tienen lugar en ésta, lo cual da una idea de la relevancia de la cromatina en la DDR. Además, algunas combinaciones de dominios también aparecieron hiperrepresentadas en las proteínas de la DDR (Figura 28B), como es el caso de PWWP + PHD-*finger*, en 3 proteínas de la DDR de cada 7 humanas, o de Bromodominio + PWWP, en 2 proteínas de la DDR de 4 humanas.



**Figura 28 | Dominios hiperrepresentados en la DDR.** (A) Esquema del análisis bioinformático llevado a cabo. Se partió de una lista de más de 700 proteínas identificadas como sustratos en un análisis fosfoproteómico de la DDR (Matsuoka et al., 2007). Se extrajeron todos los genes humanos (23.224 en total), sin considerar pseudogenes ni regiones no transcritas, así como todos los genes de las proteínas de la DDR identificadas (675 genes). De cada lista, se extrajeron los dominios proteicos según la base de datos Pfam para cada gen. Se consideró que si un gen dado produce más de una proteína, se esperan diferentes combinaciones de dominios, por lo que todas las posibles combinaciones se fusionaron en un único “gen artificial”, procedimiento que se realizó para ambas listas, con lo que de existir un error estaría presente en ambas y los cálculos seguirían siendo fiables. En la figura, los círculos representan la acotación de los dominios hiperrepresentados en la lista de la DDR en comparación con la humana, aplicando distintos niveles de significancia estadística. De 3212 dominios presentes en las proteínas de la DDR, se llegó finalmente a 9 dominios hiperrepresentados en las proteínas de la DDR en comparación con todo el proteoma humano, con un nivel de significancia del 99% obtenido al aplicar dos tests binomiales ajustados por FDR (*false discovery rate*, tasa de falsos descubrimientos) del 0.01 y Bonferroni con  $p < 0.05$ . (B) Detalle de los 9 dominios hiperrepresentados en la DDR. Se representan sus códigos de acceso en la base de datos Pfam y el número de proteínas de la lista de la DDR (barras azules) o de todo el proteoma humano (barras rojas) donde aparecen. Se señalan además ciertas combinaciones de dominios también hiperrepresentadas en la DDR, como PWWP con PHD-*finger* o con el Bromodominio. (Figuras proporcionadas por Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, IMPCC, Badalona).)

### 3.2. El dominio PWWP de MSH6 ayuda a su función

Los datos obtenidos del análisis bioinformático de dominios hiperrepresentados en la DDR nos hicieron plantearnos si el mecanismo de actuación propuesto para 53BP1 y su dominio Tudor podría

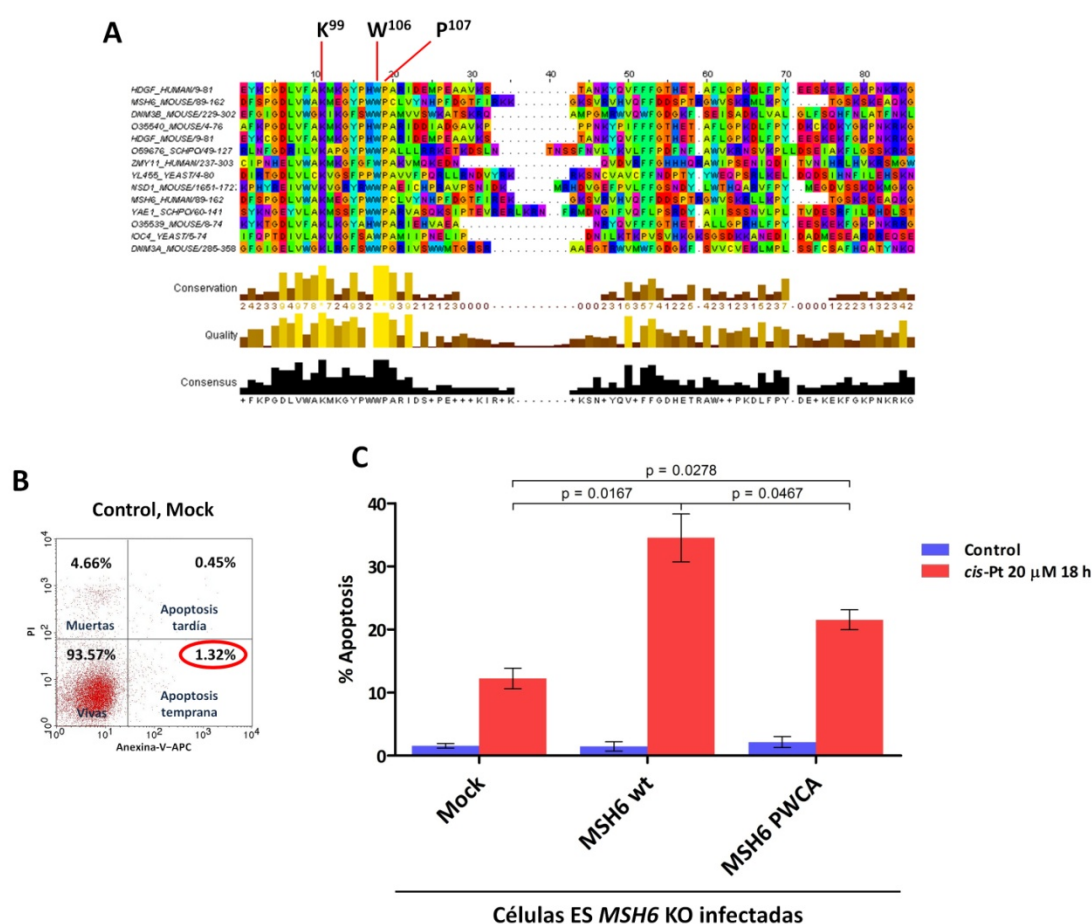
ser extensible a otras proteínas y dominios de la DDR, dado que la presencia de dominios de unión a cromatina es recurrente en éstas. Así pues, el *modus operandi* de estas proteínas manteniéndose en la cromatina a través de dominios de unión genérica a ésta a fin de mantenerse “preparadas” para efectuar su función de manera eficiente podría ser una constante en las proteínas que actúan a nivel de cromatina en general y en las de la DDR en particular.

Para extender nuestro modelo a otras proteínas y dominios de la DDR, se decidió considerar uno de esos 9 dominios hiperrepresentados en la DDR y alguna de las proteínas de la DDR que lo contienen. En concreto, se tomó el dominio PWWP, dado que con él se verificó nuestro modelo para 53BP1, al considerarlo un posible candidato a dominio de unión genérica a cromatina, y además en el momento en que se abordó este proyecto resultaba de especial interés dado que se desconocía su función. Por otra parte, se escogió la proteína MSH6 (homólogo de MutS 6, *MutS homologue 6*) de la reparación de apareamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*) del ADN, la cual contiene un dominio PWWP. Se sabe que MSH6 heterodimeriza con MSH2 para reconocer los apareamientos erróneos del ADN, esto atrae a las proteínas MLH1 y PMS2 al complejo, y se inicia así la reparación de esta lesión por la ruta correspondiente. Además, a MSH6 también se le asigna un papel señalizador hacia apoptosis, si la lesión es muy persistente (Jiricny, 2006).

Se generaron construcciones retrovirales en el vector pBABE-hygro de MSH6 wt de ratón y dos mutantes en los residuos más conservados de su dominio PWWP, K99E y PWCA (W106C + P107A), determinados por análisis bioinformático de alineamiento múltiple de secuencias (Figura 29A). Se infectaron células ES murinas *MSH6* KO con los vectores pBABE-hygro-MSH6 wt, pBABE-hygro-MSH6 PWCA y el control pBABE-hygro vacío (*mock*) (el mutante MSH6 K99E no se probó). A continuación, se analizó el MMR en las líneas generadas mediante ensayo de apoptosis inducida por cisplatino, un fenotipo clásico dependiente de MMR (Wind *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004), detectándose las células apoptóticas tempranas mediante tinción con Anexina V-APC y PI por FACS (Figura 29B). El mutante MSH6 PWCA presentó una deficiencia significativa en MMR comparado con MSH6 wt, dada por una reducción en la apoptosis inducida por cisplatino (Figura 29C). No obstante, este mutante mostró una mayor capacidad de MMR que las células *MSH6* KO, control negativo *mock*, cuyo dato representó el defecto completo en MMR a través de MSH6 (Figura 29C).

Estos resultados mostraron que una mutación crítica en el dominio PWWP se traduce en una pérdida parcial de la funcionalidad de la proteína. El proceso de MMR se sigue llevando a cabo en el mutante MSH6 PWCA, pero resulta ineficiente, del mismo modo que ocurre con los focos de 53BP1 al mutar su dominio Tudor. Ambos no resultan esenciales para que se lleve a cabo la función de la proteína, pero sí ayudan a que ésta se desempeñe de manera eficiente. De este modo, el dominio PWWP se perfila como otro dominio de adhesión genérica a la cromatina, de la misma forma que Tudor en nuestro modelo inicial para 53BP1.



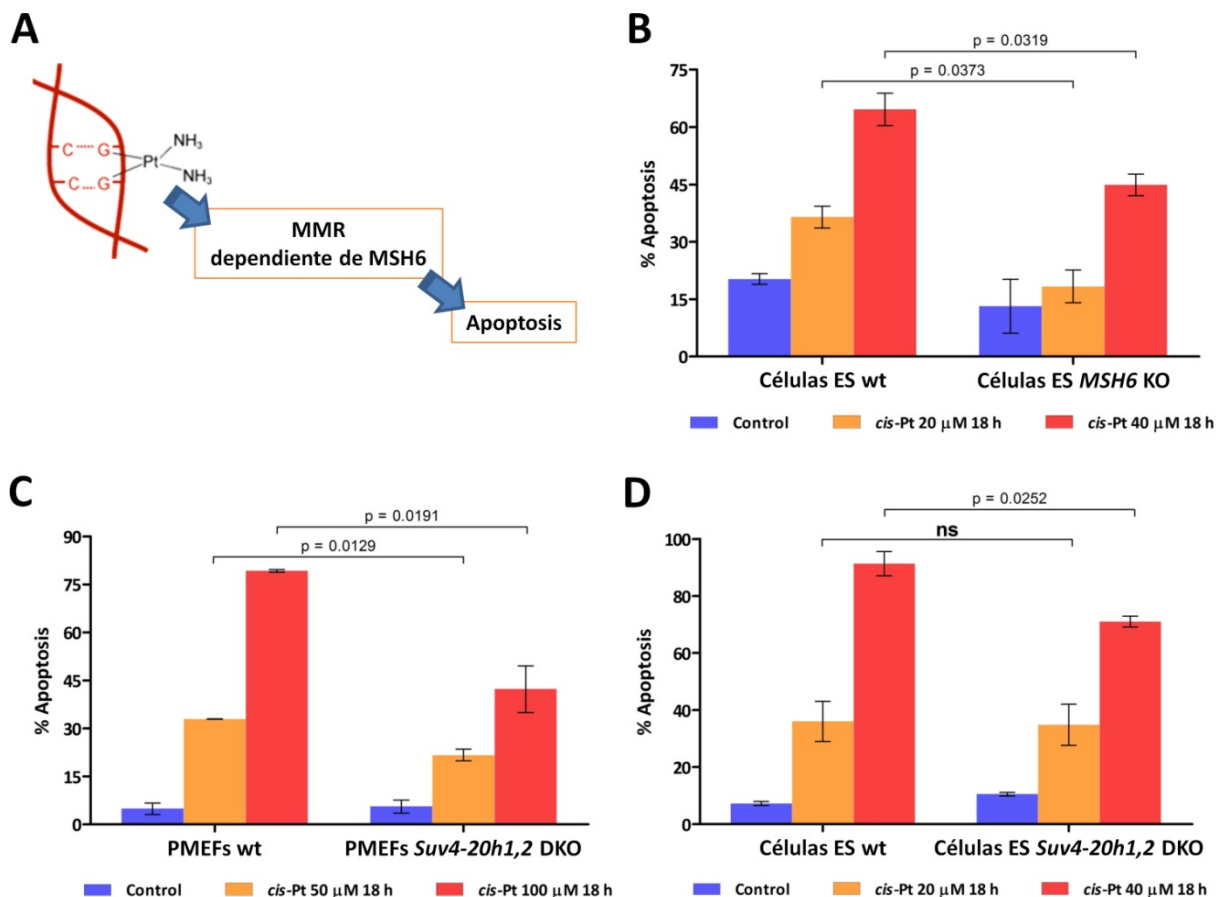


**Figura 29 | Contribución del dominio PWWP a la función de MSH6.** (A) Alineamiento múltiple de secuencias de la región del dominio PWWP de la proteína MSH6 en diferentes especies, mediante el algoritmo *ClustalW* y usando la interfaz *Jalview*<sup>®</sup>. Debajo, se muestran gráficos indicativos del grado de conservación y su calidad, así como la secuencia consenso resultante. Los residuos más conservados evolutivamente son K<sup>99</sup>, W<sup>106</sup> y P<sup>107</sup>, por lo que se introdujeron mutaciones antagónicas en ellos (K99E, PWCA) a fin de comprometer la función del dominio PWWP. (B) Detección de células apoptóticas por análisis FACS mediante tinción con Anexina V-APC y yoduro de propidio (PI). Ejemplo de una de las gráficas obtenidas, con la clasificación celular utilizada, donde cada cuadrante corresponde a células en un estado determinado. Se consideraron únicamente las células apoptóticas tempranas. (C) Ensayo de apoptosis inducida por cisplatino en células ES murinas infectadas con los vectores retrovirales pBABE-hygro (Mock), pBABE-hygro-MSH6 wt y pBABE-hygro-MSH6 PWCA. Se aplicaron tratamientos con cisplatino (*cis*-Pt) 20  $\mu$ M durante 18 h, tras las cuales se analizó la apoptosis mediante FACS. Se representan los porcentajes de células apoptóticas tempranas. Al ser un fenotipo dependiente de MSH6, la apoptosis está reducida en células sin MSH6 (Mock), se recupera en MSH6 wt y resultó ser deficiente en el mutante MSH6 PWCA.

### 3.3. Las células desprovistas de H4K20me<sub>2</sub> presentan MMR defectuoso

Una vez comprobada la contribución del dominio PWWP de MSH6 al MMR, el siguiente paso fue demostrar si este efecto está relacionado con la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>, como posible diana de unión de PWWP y del mismo modo que intervenía en nuestro modelo para 53BP1 con su dominio Tudor. Para ello, se estudió el MMR en células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>, en comparación con células wt.

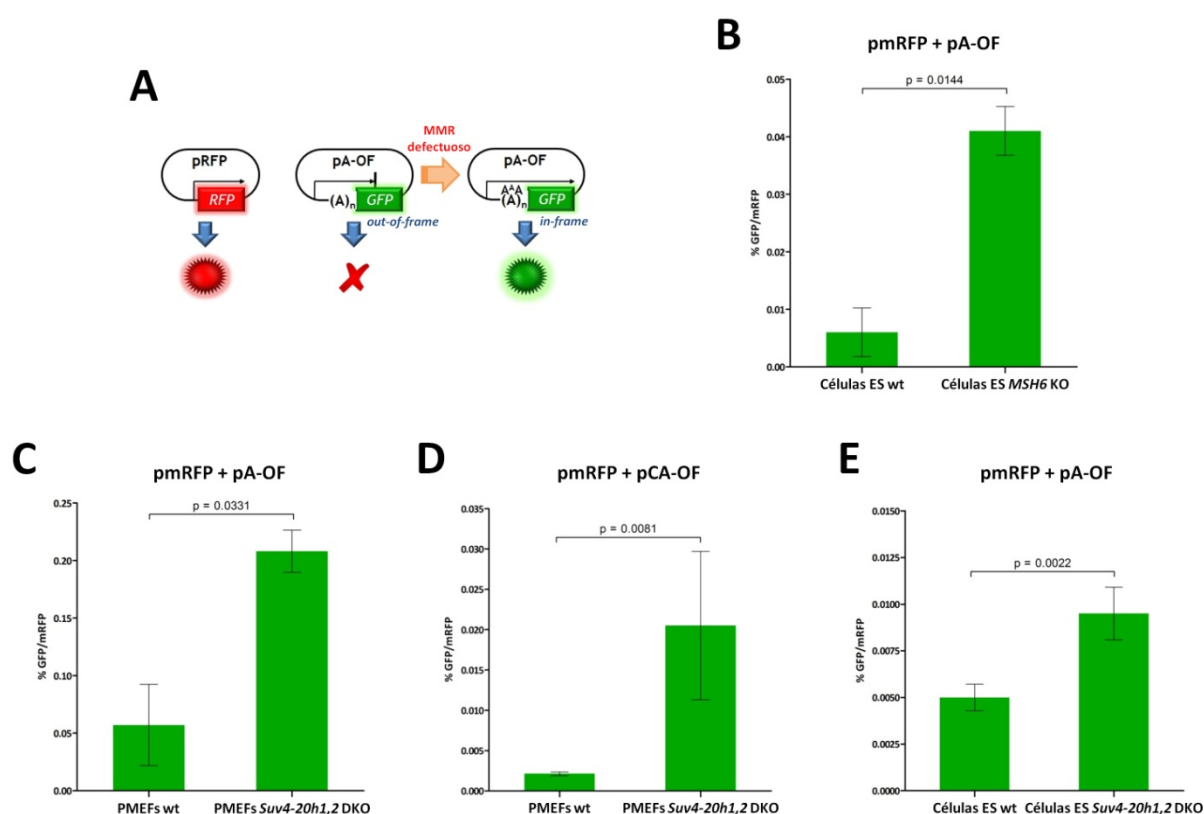
En primer lugar, se analizó el MMR mediante ensayos de apoptosis inducida por cisplatino, fenotipo dependiente de MSH6 (Figura 30A). Como control positivo, se usaron células ES murinas *MSH6* KO en comparación con su control wt (Figura 30B), en dosis crecientes de cisplatino a 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M, para comprobar que se trata de un efecto dependiente de dosis. En las células *MSH6* KO en comparación con las wt se observó la disminución esperada en la apoptosis, como consecuencia del defecto en MMR, e incluso no se apreciaron diferencias significativas entre el tratamiento a 20  $\mu$ M y el control no tratado. El mismo ensayo realizado en PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO, sin H4K20me<sub>2</sub>, frente a PMEFs wt (Figura 30C), con dosis de cisplatino de 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M, reveló que los primeros poseen un defecto intrínseco de MMR, al ver reducida la apoptosis a ambas dosis. Por último, se reprodujo el mismo ensayo en células ES murinas *Suv4-20h1,2* DKO frente a su control wt (Figura 30D), con dosis de cisplatino de 20  $\mu$ M y 40  $\mu$ M, observándose el defecto de MMR de las primeras, aunque únicamente con la dosis de 40  $\mu$ M, no existiendo diferencias significativas con la de 20  $\mu$ M. Posiblemente, el fenotipo de las células *Suv4-20h1,2* DKO no es tan evidente en células ES debido a su estado abierto de cromatina característico. En cualquier caso, los resultados indicaron que el defecto de MMR en células ES *Suv4-20h1,2* DKO no llegó a ser tan acusado como en las *MSH6* KO.



**Figura 30 | Ensayo de apoptosis inducida por cisplatino mostrando defectos de MMR en células desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>.** (A) Fundamento del ensayo. El cisplatino genera entrecruzamientos en el ADN, ante los que responde MSH6. (B) Ensayo en el control positivo: Células ES wt (línea RH3186) frente a *MSH6* KO. Las barras representan porcentajes de células apoptóticas totales, detectadas por FACS. (C) Ensayo en PMEFs wt (líneas E69.1 y E69.2) frente a *Suv4-20h1,2* DKO (líneas E70.2 y E70.6). (D) Ensayo en células ES wt (línea wt26) frente a *Suv4-20h1,2* DKO (líneas B4-2 y B7-1♀).



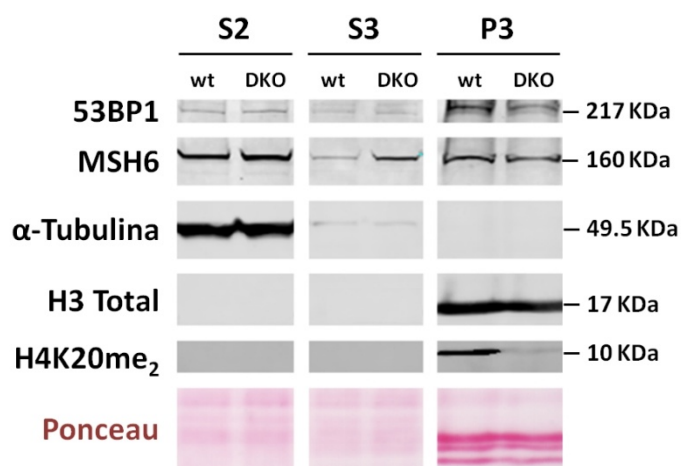
Para analizar el MMR también se usaron ensayos de inestabilidad de microsatélites (MSI, *microsatellite instability*) con los sistemas informadores pmRFP + pA-OF y pmRFP + pCA-OF (descritos en la sección de Materiales y Métodos) (Figura 31A). En células ES sólo el primer sistema funcionó de manera coherente, por lo que fue el que se empleó para éstas. Se aplicó el ensayo al control positivo, células ES murinas *MSH6* KO en comparación con su control wt (Figura 31B), observándose el defecto de MMR de las primeras por incremento de la señal de GFP respecto a la de mRFP. A continuación, se efectuó el ensayo de MSI con el sistema pmRFP + pA-OF en PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO, carentes de H4K20me<sub>2</sub>, frente a sus controles PMEFs wt (Figura 31C), resultando que en las primeras el MMR fue también significativamente defectuoso. El mismo resultado se obtuvo en las mismas células usando el sistema pmRFP + pCA-OF (Figura 31D). Al realizar el ensayo en células ES murinas *Suv4-20h1,2* DKO en comparación con su control wt, se reprodujeron los mismos resultados, haciéndose evidente el defecto en MMR de las células desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>, donde de nuevo no llegó a ser tan acusado como en las *MSH6* KO. Al igual que ocurrió con el ensayo equivalente de apoptosis inducida por cisplatino, las diferencias en células ES no son tan visibles como en PMEFs, quizá debido a su estado abierto de cromatina característico.



**Figura 31 | Ensayo de inestabilidad de microsatélites (MSI) mostrando defectos de MMR en células desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>.** (A) Sistema informador de MSI. Un plásmido pRFP produce proteína funcional, usada como control de transfección. Otro plásmido pA-OF (o pCA-OF) contiene el gen *GFP* fuera del marco de lectura con respecto a su promotor debido a la inserción de un microsatélite. Ante defecto en MMR, éste se desorganiza, se recupera el marco de lectura y la proteína se expresa. (B) Ensayo en el control positivo: Células ES wt (línea RH3186) frente a *MSH6* KO. Las barras representan porcentajes de señal GFP respecto a mRFP, analizado por FACS. (C) Ensayo en PMEFs wt (líneas E69.1 y E69.2) frente a *Suv4-20h1,2* DKO (líneas E70.2 y E70.6). (D) El mismo ensayo, pero usando pCA-OF. (E) Ensayo en células ES wt (línea wt26) frente a *Suv4-20h1,2* DKO (líneas B4-2 y B7-1♀).

### 3.4. H4K20me<sub>2</sub> mantiene la localización cromatínica de MSH6

Para tratar de verificar si los fenotipos observados se explican por cambios en la localización cromatínica de MSH6 debidos a la interacción de su dominio PWWP con la marca H4K20me<sub>2</sub>, se estudió la localización de la proteína mediante fraccionamiento bioquímico de cromatina seguido de *Western blot* en células ES murinas wt y *Suv4-20h1,2* DKO (Figura 32), dado que el anticuerpo anti-MSH6 no funcionó en PMEFs. Los resultados obtenidos mostraron que MSH6 está presente en las tres fracciones celulares. La mayor parte de la proteína se detectó en la fracción citosólica, pero ligeramente más en las células *Suv4-20h1,2* DKO con respecto a las wt. Gran cantidad de ella también se localizó en la fracción cromatínica, aunque ligeramente en menor cantidad en las células *Suv4-20h1,2* DKO comparadas con las wt. Sin embargo, es en la fracción nucleoplásmica donde se apreciaron mejor las diferencias, ya que en las células *Suv4-20h1,2* DKO se detectó una mayor cantidad de MSH6 en comparación con las wt. Por tanto, H4K20me<sub>2</sub> podría estar manteniendo la localización cromatínica de MSH6, previniendo que la proteína pase a localizarse dispersa por el nucleoplasma. Además, se verificaron la ausencia de H4K20me<sub>2</sub> en las células *Suv4-20h1,2* DKO y la menor presencia de 53BP1 en la fracción cromatínica en comparación con las células wt.



**Figura 32 | MSH6 se mantiene unida a la cromatina gracias a H4K20me<sub>2</sub>.** *Western blot* de un fraccionamiento bioquímico de cromatina en células ES murinas *Suv4-20h1,2* DKO y wt. En las *Suv4-20h1,2* DKO, la ausencia de H4K20me<sub>2</sub> se correlacionó con una menor afinidad de 53BP1 y MSH6 por la cromatina (fracción P3). Mayor cantidad de MSH6 pasó a localizarse en las fracciones nucleoplásmica (S3), principalmente, y citosólica (S2), en menor medida. Se usaron histona H3 total como control de carga de la fracción cromatínica y α-Tubulina para la citosólica.

Por otra parte, se trató de verificar este resultado mediante FRAP de GFP-MSH6 en PMEFs *Suv4-20h1,2* DKO frente a wt. Sin embargo, la transfección de GFP-MSH6 ocasionó en todos los casos altas tasas de apoptosis independiente de p53 (también se produjo en MEFs *p53* KO), algo que podría deberse a los efectos tóxicos de la sobreexpresión de MSH6 como señalizador de apoptosis. Este fenómeno también ha sido puesto de manifiesto por el grupo de Josef Jiricny (*Institute of Molecular*

*Cancer Research, University of Zurich*, Zúrich, Suiza) (comunicación personal). Al contrario de lo que cabría esperar, ambas cinéticas de FRAP resultaron ser prácticamente idénticas y más acorde con las de proteínas con poca afinidad por la cromatina. No obstante, este resultado no es concluyente dado que los experimentos de FRAP se realizaron 12-14 h tras la electroporación en células sufriendo apoptosis temprana, no encontrándose en las condiciones fisiológicas de las células vivas.

### 3.5. Dificultades y problemas en el análisis funcional del dominio PWWP de MSH6

Con el objetivo de seguir verificando nuestro modelo con el dominio PWWP de MSH6, se intentó analizar la afinidad por la cromatina mediante FRAP de las proteínas GFP-MSH6 wt, dos mutantes de su dominio PWWP (GFP-MSH6 PWCA y GFP-MSH6 K99E) para los que se esperaba pérdida de afinidad por la cromatina, y un mutante de recuperación GFP-MSH6 PWCA-Tudor con el que se esperaba recuperar la afinidad por la cromatina. Sin embargo, los experimentos no fueron posibles debido a las altas tasas de apoptosis p53-independiente en las células transfectadas (todas muertas a las 20 h post-electroporación), quizá debida a efectos tóxicos de la sobreexpresión de MSH6 desde el vector pcDNA 3.1, que no aparecieron en el pBABE-hygro, de expresión más moderada, usado en los experimentos de infección. Esto impidió realizar experimentos de fraccionamiento de cromatina, apoptosis inducida por cisplatino o MSI. Únicamente el FRAP fue aparentemente posible, pero se obtuvieron resultados como los anteriormente descritos, contradictorios y propios de células en apoptosis temprana, que no resultaron concluyentes. Además, las proteínas mutantes formaron en todos los casos fuertes agregados proteicos citosólicos y nucleares, posiblemente ocasionados por un mal plegamiento de las proteínas. Los mismos efectos se observaron con las versiones de las proteínas etiquetadas con mRFP. En definitiva, todo ello impidió el análisis funcional del dominio PWWP de MSH6 con respecto a su capacidad de direccionalizar a la proteína a la cromatina.

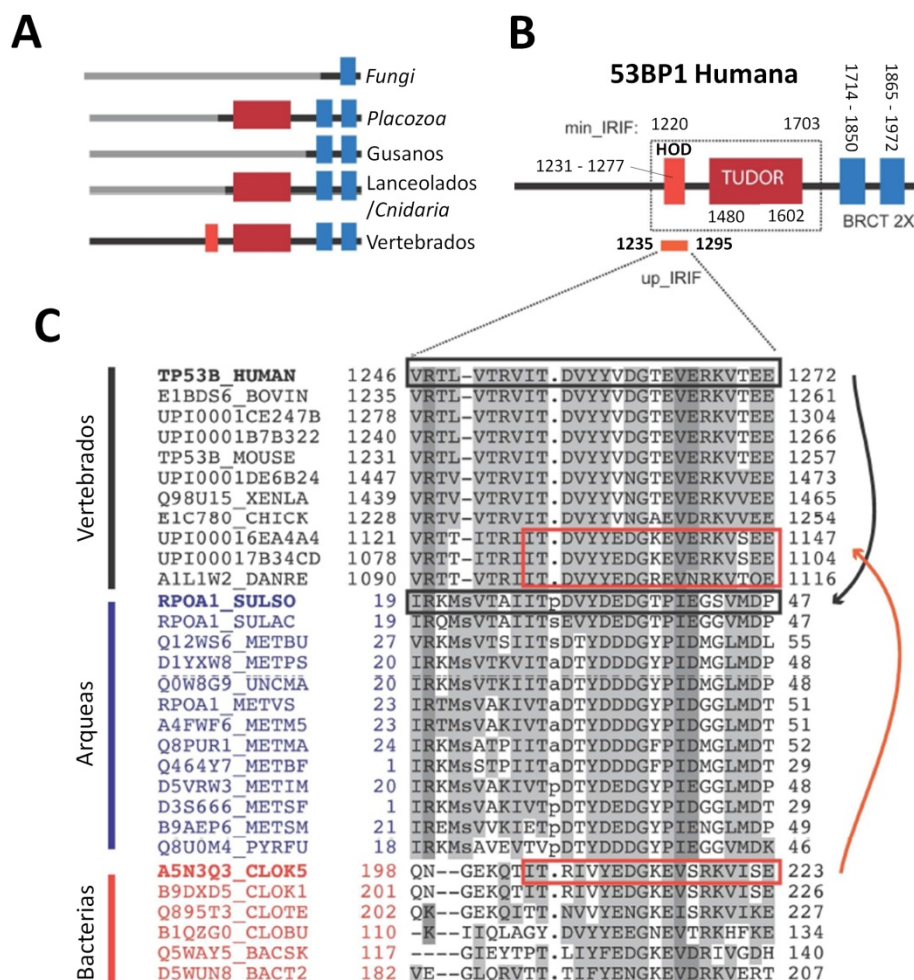
## 4. Estudio de la unión de 53BP1 al ADN

### 4.1. Búsqueda de una nueva región formadora de focos en 53BP1

- **Identificación de una nueva región conservada en 53BP1:**

Como hemos visto, nuestro modelo de formación de focos de 53BP1, al asignar al dominio Tudor una función genérica de unión constitutiva a la cromatina, predice la existencia en la proteína de una nueva región formadora de focos (FFR, *foci-forming region*) no descrita con anterioridad, contenida en el interior de la región mínima formadora de focos (IRIF) de 53BP1, y encargada del reclutamiento a las DSBs. Con el propósito de encontrar dicha región, se llevó a cabo un análisis bioinformático de búsqueda de regiones conservadas en 53BP1 (Figura 33), realizado por Ana Rojas

(Grupo de Biología Celular Computacional, Instituto de Medicina Predictiva y Personalizada del Cáncer (IMPCC), Badalona), quien también abordó el resto de análisis bioinformáticos de esta sección. Para ello, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias usando modelos ocultos de Markov (HMMs, *hidden Markov models*), que permitieron detectar homólogos remotos. Se encontró una región conservada únicamente en vertebrados de unos 60 residuos (aminoácidos 1235-1295 de 53BP1 humana) localizada dentro de la región IRIF de 53BP1, por delante del dominio Tudor en tándem y del tracto RG, que, curiosamente, aparece también en especies de bacterias y arqueas, y que presentó homología con una región de ARN polimerasas de arqueas, posiblemente incorporada a lo largo de la evolución por transferencia génica horizontal. Posteriormente, el grupo de Thanos Halazonetis identificó una región similar y la describió como dominio de oligomerización (HOD, residuos 1231-1277) (Zgheib *et al.*, 2009).

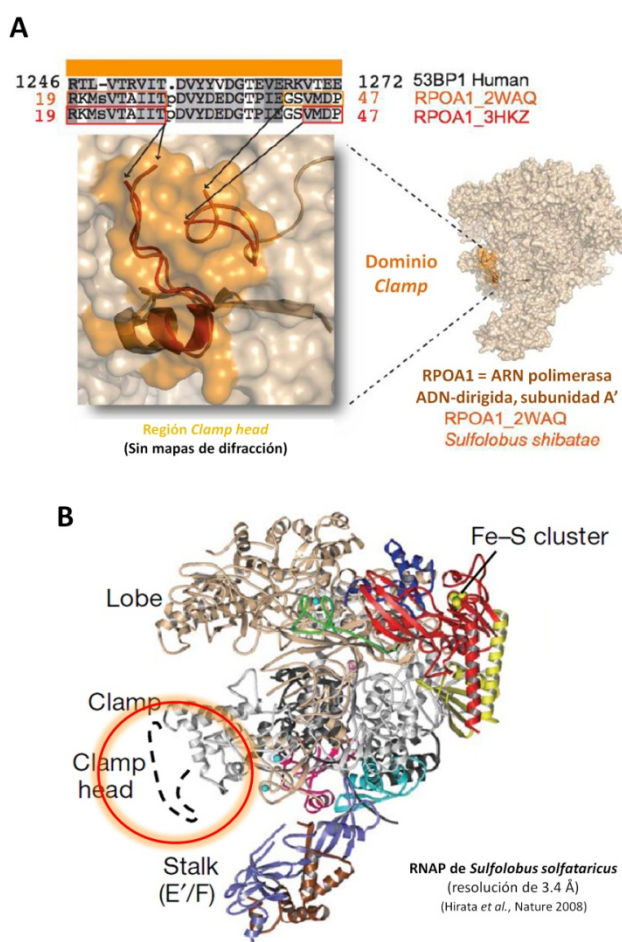


**Figura 33 | Identificación de una nueva región conservada en 53BP1. (A)** Arquitecturas en dominios de proteínas ortólogas de 53BP1 en diferentes grupos de organismos. Las longitudes de las proteínas no están escaladas. Las líneas negras sólidas indican homología de secuencia con 53BP1 humana, y las grises sólidas indican ninguna similitud de secuencia. Solamente las proteínas de vertebrados contienen la región de homología encontrada en especies de bacterias y arqueas (recuadro naranja). Recuadro rojo = Dominio Tudor en tándem. Recuadros azules = Dominios BRCT. **(B)** Arquitectura en dominios de 53BP1 humana. “min\_IRIF” es IRIF, región mínima formadora de focos. “up\_IRIF” es la región de homología encontrada en bacterias y arqueas. **(C)** Alineamiento múltiple de secuencias proteicas con homología con la región encontrada, mostrando las relaciones entre la secuencia de vertebrados y las de arqueas y bacterias. (Figuras proporcionadas por Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, IMPCC, Badalona).)

- **La nueva región conservada en 53BP1 (SSDB) podría unirse a ssDNA:**

La proteína con la que se encontró mayor homología para esta región fue RPOA1, una ARN polimerasa ADN-dirigida, subunidad A', de arqueobacterias. Dado que la estructura de esta proteína fue resuelta por cristalografía y difracción de rayos X en *Sulfolobus shibatae* (Korkhin *et al.*, 2009) y *Sulfolobus solfataricus* (Hirata *et al.*, 2008), el siguiente paso fue localizar el segmento de aminoácidos en la estructura de la proteína, para comprobar si pertenece a algún dominio clave que pudiera arrojar pistas sobre su posible función (Figura 34). Curiosamente, mapeó justo en la única región de la estructura que no estaba resuelta, ya que su desorden estructural intrínseco impidió la obtención de mapas de difracción. Esta región constituye el *Clamp head*, la cabeza (*head*) del dominio Grapa (*Clamp*) de RPOA1, a la que se le asigna una función de posicionamiento de la ARN polimerasa por unión a ssDNA. Esto permitió esbozar la idea de que la región homóloga de 53BP1 podría desempeñar la misma función, es decir, unión a ssDNA. Por este motivo, dicha región (residuos 1235-1295) se designó como SSDB (de unión a ADN de cadena sencilla, *single-stranded DNA-binding*). El hecho de que, al igual que

la región *Clamp head* de RPOA1, también posea estructura intrínsecamente desordenada, apoya la idea de que pueda tener esta función de unión, ya que el desorden estructural intrínseco es un fenómeno inherente a las regiones sometidas a *folding-upon-binding* ("plegamiento con la unión").

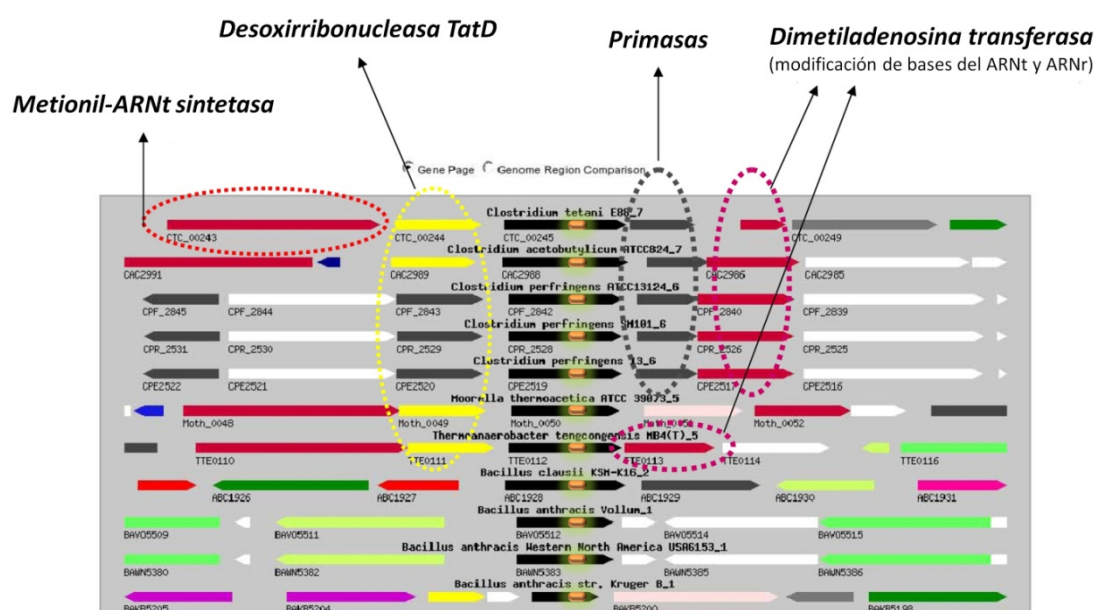


**Figura 34 | Localización de la región SSDB de 53BP1 en la proteína RPOA1. (A)** Alineamiento de la secuencia de la región SSDB de 53BP1 con sus homólogas de la proteína RPOA1 (ARN polimerasa ADN-dirigida, subunidad A') en las arqueas *Sulfolobus shibatae* (naranja, identificador PDB 2WAQ) y *Sulfolobus solfataricus* (rojo, PDB 3HKZ), cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía. SSDB mapea justo en la región *Clamp head* de RPOA1, que carece de mapas de difracción y que está implicada en unión a ssDNA. (Figura proporcionada por Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, IMPCC, Badalona).) **(B)** Estructura de RPOA1 (RNAP, ARN polimerasa) de la arquea *Sulfolobus solfataricus*, mostrando sus diferentes regiones y en concreto la *Clamp head* (dentro del círculo), con la que presenta homología la región SSDB encontrada en 53BP1. (Adaptado de Hirata *et al.*, 2008.)



- Los genes procariotas que contienen la secuencia homóloga a la región SSDB de 53BP1 aparecen en operones relacionados con el metabolismo de los ácidos nucleicos:

Más aún, se analizó el contexto genómico circundante a las secuencias homólogas a la región SSDB encontrada en distintos microorganismos procariotas y se encontró que los genes que la contienen se encuentran formando parte de operones relacionados con el procesamiento de ácidos nucleicos, los cuales incluyen los genes de enzimas tales como primasas, aminoacil-ARNt sintetetas, nucleasas o enzimas de modificación de bases del ARNt y el ARNr (Figura 35). Esto podría indicar que la secuencia hallada podría estar contenida en proteínas implicadas en el procesamiento de los ácidos nucleicos, y por tanto poseer una función relacionada, lo que apoya nuestra hipótesis de que la región SSDB podría tener actividad de unión al ADN.

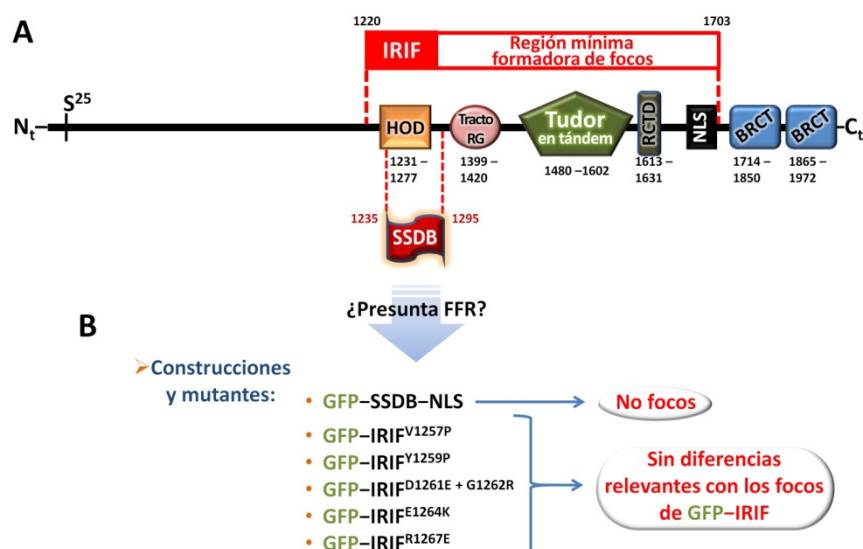


**Figura 35 | Genes procariotas que contienen la secuencia homóloga a la región SSDB de 53BP1.** Alineamiento de secuencias de nucleótidos homólogas a la región SSDB hallada en 53BP1 (zona naranja brillante) en diferentes especies de bacterias y arqueas. Para cada microorganismo, se muestra el gen que contiene la secuencia (en negro), así como los genes circundantes dentro del contexto genómico. Éstos están incluidos en operones relacionados con el metabolismo de ácidos nucleicos. Se muestran las proteínas codificadas por algunos de sus genes. (Figura proporcionada por Ana Rojas (Grupo de Biología Celular Computacional, IMPCC, Badalona).)

- Estudio de la región SSDB de 53BP1 como posible región formadora de focos (FFR):

En principio, para estudiar si la región SSDB pudiera ser la región formadora de focos (FFR) real de 53BP1 (Figura 36), se realizaron ensayos de formación de focos con la proteína GFP–SSDB–NLS (incluyendo una señal de localización nuclear, NLS, *nuclear localization signal*) y para una batería de mutantes puntuales de los residuos más conservados de dicha región en la proteína GFP–IRIF (GFP–IRIF<sup>V1257P</sup>, GFP–IRIF<sup>Y1259P</sup>, GFP–IRIF<sup>D1261E+G1262R</sup>, GFP–IRIF<sup>E1264K</sup> y GFP–IRIF<sup>R1267E</sup>). Sin embargo, ni siquiera se observaron focos ineficientes de GFP–SSDB–NLS y los mutantes no

mostraron diferencias relevantes en formación de focos comparados con GFP-IRIF. Los estudios realizados por Thanos Halazonetis en los que identificó una región similar como HOD incluyen la generación de mutantes puntuales que sí veían comprometida la formación de focos (D1256A, V1257A, Y1258A + Y1259A, V1260A y D1261A) (Zgheib *et al.*, 2009). Posteriormente, los grupos de André y Michel Nussenzweig comprobaron que el mutante 53BP1  $\Delta$ HOD es incapaz de formar focos y presenta defectos en CSR (Bothmer *et al.*, 2011), poniendo de manifiesto nuevamente la importancia de esta región.



**Figura 36 | Región SSDB de 53BP1 como posible región formadora de focos (FFR).** (A) Acotamiento de la región SSDB de 53BP1 dentro de la secuencia de la proteína. Puede observarse su solapamiento con el dominio HOD (de oligomerización). (B) Estudios realizados para comprobar su papel como posible región formadora de focos (FFR). Por sí misma, no formó focos. Sus mutantes puntuales tampoco los perdieron.

## • Hipótesis emitidas en torno a la región SSDB de 53BP1:

En nuestro caso, continuamos la investigación estudiando si la región SSDB/HOD o la misma IRIF entera de 53BP1, de acuerdo con las predicciones *in silico*, podría unirse a ssDNA o a otra especie de ADN. El interés de estos estudios radica, por una parte, en que esta interacción podría ser la responsable del reclutamiento de 53BP1 a las DSBs, con la región SSDB actuando como FFR y el propio ADN dañado como señal de reclutamiento.

Por otro lado, empezamos a emitir hipótesis sobre un posible papel de 53BP1 en la respuesta a estrés replicativo mediante su posible unión a ssDNA. Como apoyo a esta hipotética nueva función de 53BP1 están ciertos trabajos que muestran que 53BP1 interacciona con la helicasa BLM en su función antirrecombinogénica, limitando HR y resección (Tripathi *et al.*, 2008). Paralelamente, el análisis detallado en nuestro laboratorio de tinciones inmunofluorescentes de 53BP1 obtenidas en condiciones de estrés replicativo reveló que ésta parecía localizarse en los extremos de regiones ricas en RPA

(proteína de unión a ssDNA), lo que nos llevó a pensar que 53BP1 podría estar previniendo la generación de ssDNA mediante una limitación de resección a través de su unión a las interfases de dsDNA y ssDNA, donde podría estar inhibiendo a las helicasas promotoras de resección (p. ej., BLM). En esta sección nos centraremos en el análisis de la posible unión de 53BP1 al ADN mediante ensayos *in vitro*. Las investigaciones en torno a los resultados de inmunofluorescencia de 53BP1 y RPA acabaron generando un nuevo proyecto que constituye la segunda parte de esta tesis doctoral.

## 4.2. Producción y purificación de proteínas recombinantes

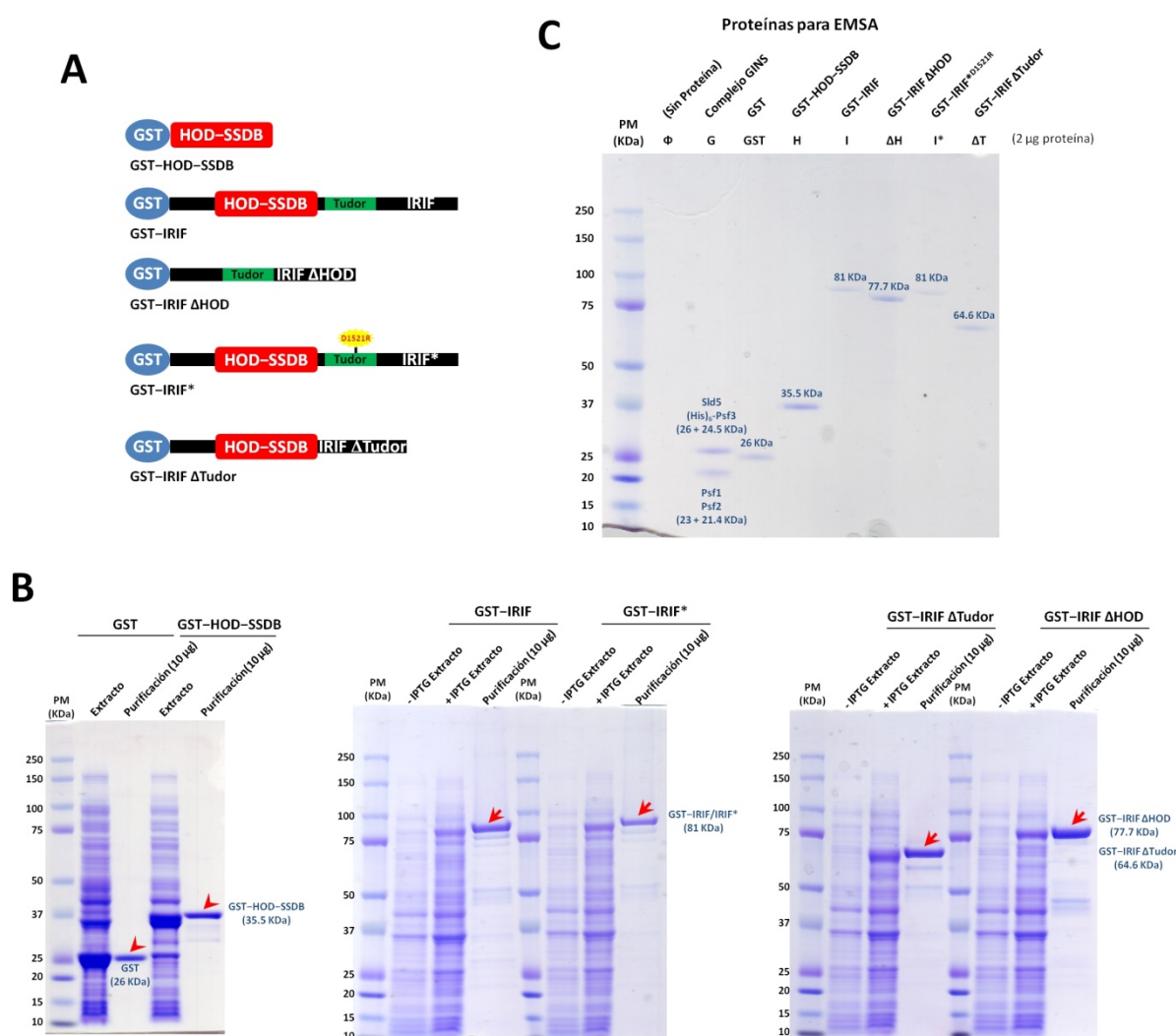
Dado que se decidió estudiar la unión de 53BP1 al ADN mediante abordajes *in vitro*, el primer paso fue la producción y purificación de un conjunto de proteínas recombinantes relacionadas con la región SSDB de 53BP1 predicha *in silico*. Todas ellas se fusionaron a GST (glutación-S-transferasa) para su purificación por cromatografía de afinidad con glutatión (GSH). El conjunto de proteínas derivadas de 53BP1 generadas se muestra en la Figura 37A, e incluye GST-HOD-SSDB (35.5 KDa, residuos 1211-1297 de 53BP1, región que abarca el dominio HOD y la región SSDB predicha, delimitada por algunos aminoácidos más a fin de abarcar motivos completos con cierta estructura secundaria definida), GST-IRIF (81 KDa), GST-IRIF  $\Delta$ HOD (77.7 KDa, con el dominio HOD, residuos 1231-1277, delecionado, suponiendo ello una disrupción de la región HOD-SSDB), GST-IRIF\*<sup>D1521R</sup> (81 KDa, el mutante puntual del dominio Tudor) y GST-IRIF  $\Delta$ Tudor (64.6 KDa). Además, se produjo también la propia proteína GST (26 KDa), como control negativo para asegurar que los efectos observados no se deben a su fusión. Todas estas proteínas de produjeron en *E. coli* y se purificaron siguiendo los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados de su producción y purificación se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y posterior tinción de los geles con azul de *Coomassie*, detectándose las proteínas y su pureza relativa por el peso molecular y la limpieza de la banda predicha obtenida (Figura 37B). Finalmente, todas las proteínas usadas para ensayos EMSA se visualizaron en un gel en la cantidad precisa usada para tales ensayos (2  $\mu$ g de proteína), para verificar la presencia y pureza de cada una de ellas (Figura 37C). Se añadió además el complejo GINS ya purificado, un complejo de unión inespecífica al ADN constituido por 4 subunidades (Sld5, 26 KDa; Psf3, 24.5 KDa, etiquetado como (His)<sub>6</sub>-Psf3; Psf1, 23 KDa; y Psf2, 21.4 KDa), usado como control positivo de unión al ADN.

## 4.3. La región HOD-SSDB de 53BP1 no se une por sí sola al ADN

El primero de los experimentos *in vitro* de unión al ADN consistió en determinar si el péptido HOD-SSDB es capaz de llevar a cabo por sí solo dicha interacción. Para ello, se efectuaron ensayos EMSA (de cambio de movilidad electroforética, *electrophoretic mobility shift assay*) incubando la proteína GST-HOD-SSDB con diferentes sondas que representan distintas estructuras de ADN, preparadas por el procedimiento descrito en la sección de Materiales y Métodos. Las sondas usadas



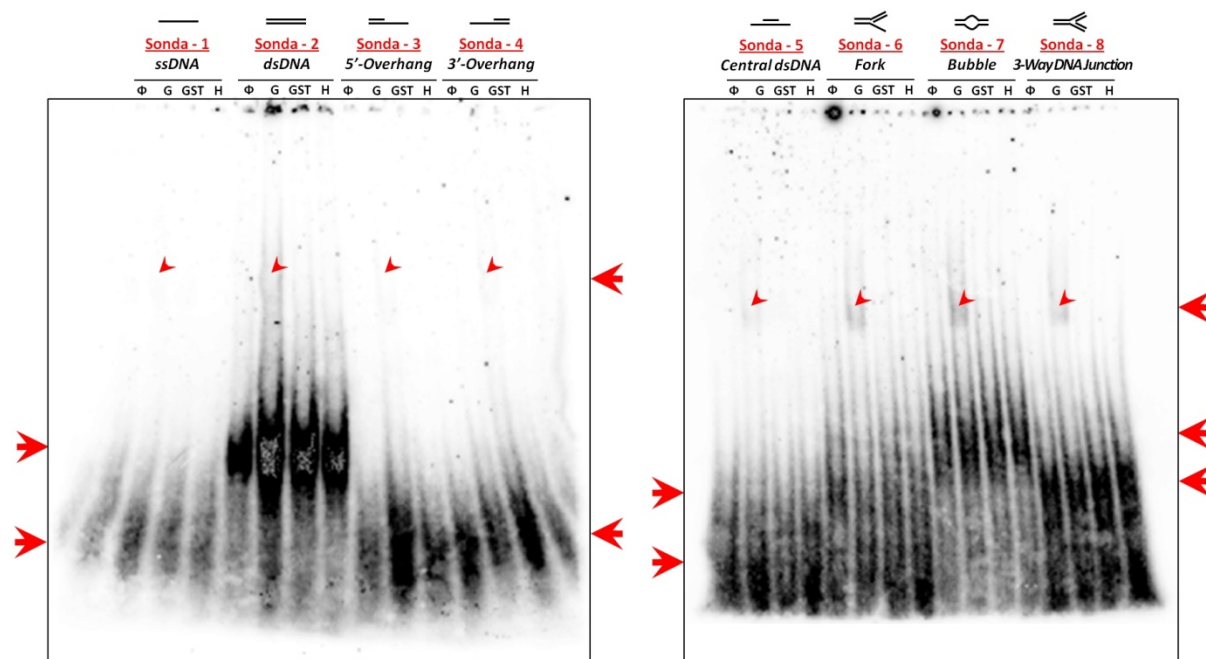
fueron: *ssDNA* (ADN monocatenario), *dsDNA* (ADN bicatenario), *5'-Overhang* (extremo 5'-protuberante), *3'-Overhang* (extremo 3'-protuberante), *Central dsDNA* (tramo de ADN bicatenario central, con extremos 5'- y 3'-protuberantes en una cadena), *Fork* (horquilla), *Bubble* (burbuja) y *3-Way DNA Junction* ("Chicken Foot") (intersección de ADN de 3 vías, "pie de pollo").



**Figura 37 | Producción y purificación de proteínas recombinantes usadas para ensayos *in vitro* de unión al ADN.**

(A) Esquema de las proteínas generadas. (B) Producción y purificación de las diferentes proteínas recombinantes. Tinción con azul de *Coomassie* de geles de electroforesis SDS-PAGE. Se muestran extractos de proteína total bacteriana (7.5 μL cargados), en algunos casos antes de la inducción con IPTG ("–IPTG") y después de ésta justo al final de la producción ("++IPTG"), y proteínas purificadas (10 μg cargados). Las proteínas se identificaron en base al peso molecular de sus bandas. (C) Electroforesis SDS-PAGE de todas las proteínas usadas en los ensayos EMSA en la cantidad presente en las reacciones (2 μg cargados). Cada símbolo representa la proteína en cuestión.

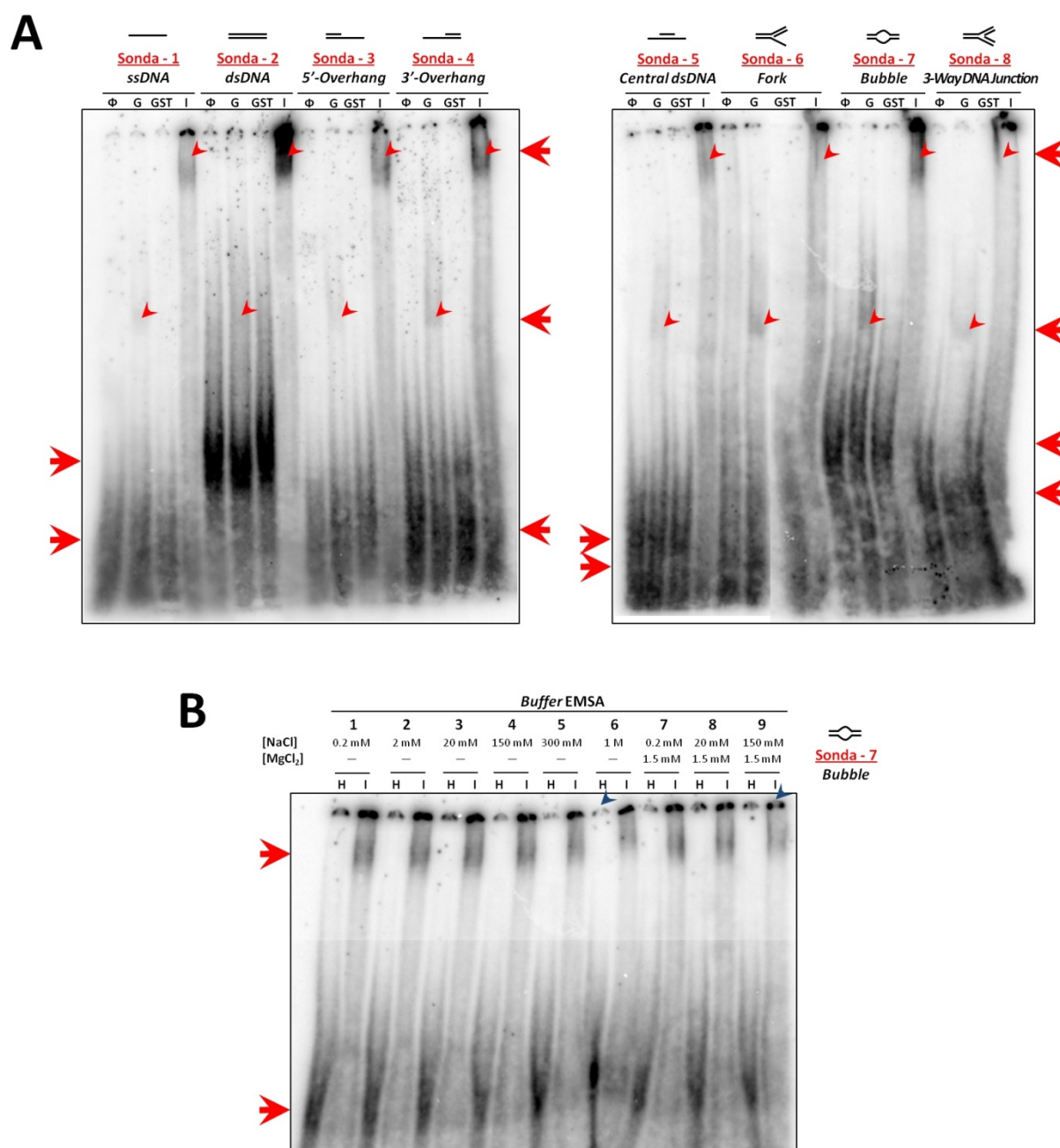
Con ninguna de las sondas se apreció unión de la proteína GST–HOD–SSDB al ADN (Figura 38), del mismo modo a como ocurrió con los controles negativos GST y sin proteína. En estas muestras únicamente se apreciaron las diferentes bandas correspondientes a las sondas. El complejo GINS, control positivo de unión inespecífica al ADN, sí mostró unión al ADN con todas las sondas, puesta de manifiesto por el retraso electroforético (*shifting*) idéntico apreciable con todas ellas.



**Figura 38 | Ensayos EMSA con la proteína GST-HOD-SSDB.** Imagen digitalizada de la autorradiografía obtenida. 2  $\mu$ g de proteína se incubaron con las sondas mostradas en la parte superior.  $\Phi$  = Sin proteína; G = Complejo GINS; H = GST-HOD-SSDB. Las flechas grandes laterales indican la presencia de bandas. Las inferiores son las correspondientes a las distintas sondas, características de cada una de ellas y diferentes según su peso molecular. Las superiores señalan la banda de retraso electroforético (*shifting*) debida a la unión de GINS al ADN, la cual es siempre idéntica (ya que depende de la proteína) y se señala además con flechas pequeñas en cada carril. Esta unión se detectó para todas las sondas. En cambio, ni GST-HOD-SSDB ni los controles negativos GST y sin proteína presentaron unión a ninguna sonda.

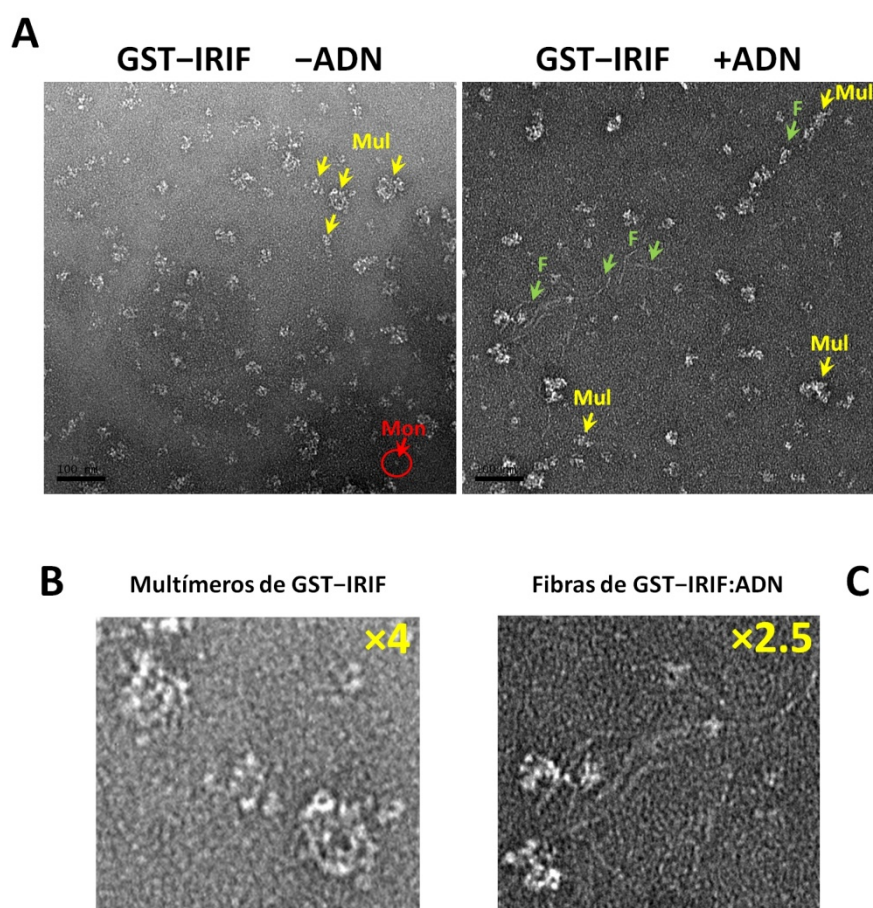
#### 4.4. La región IRIF de 53BP1 se une al ADN

Aunque no se detectó interacción con ADN para el péptido HOD-SSDB por sí solo, no puede descartarse que esta región pudiera ser funcional únicamente en el contexto de la proteína entera, esto es, dentro de la región IRIF de 53BP1. Por ello, se realizó el mismo ensayo EMSA con la proteína GST-IRIF y las mismas sondas (Figura 39A). En esta ocasión, sí se detectó claramente unión al ADN para la proteína GST-IRIF, con una banda de retraso electroforético (*shifting*) muy acusada para todas las sondas usadas. La mayor intensidad de dicha banda con las sondas *dsDNA* y *Bubble*, y, en menor medida, con la *3'-Overhang*, permitió concluir que la región IRIF se une preferentemente a ADN bicatenario y a estructuras burbuja, y, con algo menos de afinidad, a los extremos 3'-protuberantes. Se detectó también el retraso electroforético debido a la unión del complejo GINS, control positivo, a todas las sondas, no apareciendo unión para los controles negativos sin proteína ni para GST. Del mismo modo, se detectaron las bandas correspondientes a las sondas, acordes con el diferente peso molecular de cada una de ellas.



**Figura 39 | Ensayos EMSA mostrando la unión al ADN de la región IRIF de 53BP1.** Imágenes digitalizadas de las autorradiografías obtenidas. En todos los casos se incubaron 2 µg de proteína. Φ = Sin proteína; G = Complejo GINS; I = GST-IRIF; H = GST-HOD-SSDB. **(A)** Ensayos EMSA con la proteína GST-IRIF y las sondas mostradas en la parte superior. La banda de retraso electroforético de GST-IRIF (flechas grandes laterales de la zona superior y flechas pequeñas en cada carril) muestra que se une a todas las sondas, con preferencia por dsDNA y estructuras *Bubble*, y, en menor medida, extremos 3'-protuberantes, dada la mayor intensidad de dicha banda para estas sondas. Se aprecia también la banda de retraso electroforético perteneciente al control positivo GINS para todas las sondas (flechas grandes laterales de la zona intermedia y flechas pequeñas en cada carril). Ni GST-HOD-SSDB ni los controles negativos GST y sin proteína presentaron unión a ninguna sonda. Pueden apreciarse las bandas correspondientes a las distintas sondas, según su peso molecular (flechas grandes laterales de la zona inferior). **(B)** Ensayos EMSA con la sonda *Bubble* y las proteínas GST-HOD-SSDB y GST-IRIF a concentraciones salinas crecientes, a fin de tratar de solubilizar estas proteínas. Las concentraciones de Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> empleadas en los distintos *bufferes* de EMSA se muestran en la parte superior. Aunque se logró solubilizar ambas proteínas (GST-HOD-SSDB con el *buffer* EMSA #6 y GST-IRIF con el *buffer* EMSA #9, marcado con flechas azules en los carriles correspondientes), GST-HOD-SSDB siguió sin mostrar unión al ADN, y la de GST-IRIF apenas se vio alterada. Las bandas de retraso electroforético (superior) y de la sonda (inferior) se señalan con flechas grandes laterales.

Tanto en este experimento con la proteína GST-IRIF como en el anterior con GST-HOD-SSDB, llamó especialmente la atención la presencia de una cantidad importante de señal en el propio pocillo, lo cual se debe a proteína no solubilizada. Para verificar que la unión de IRIF al ADN no resultó accidental y propiciada por este fenómeno, así como tratando de detectar una posible unión de HOD-SSDB al ADN que hubiera podido pasar inadvertida, se llevó a cabo un ensayo EMSA con la sonda *Bubble*, por la que se detectó gran afinidad para la región IRIF, y únicamente ambas proteínas, GST-HOD-SSDB y GST-IRIF, a concentraciones salinas crecientes en el *buffer* EMSA usado para la reacción de unión al ADN (Figura 39B). Éstas se lograron incrementando las concentraciones de NaCl y MgCl<sub>2</sub> en dicho *buffer*. Aunque se llegó a unas condiciones óptimas de solubilización de la proteína GST-HOD-SSDB (*buffer* EMSA #6: [Na<sup>+</sup>] = 1 M, sin Mg<sup>2+</sup>) y de mayor solubilización de GST-IRIF (*buffer* EMSA #9: [Na<sup>+</sup>] = 150 mM, [Mg<sup>2+</sup>] = 1,5 mM), siguió sin detectarse unión de GST-HOD-SSDB al ADN y la unión de GST-IRIF a éste se mantuvo, aunque resultó ser ligeramente más débil (intensidad algo menor de la banda de retraso electroforético) al solubilizar la proteína (*bufferes* EMSA #6 y #9).



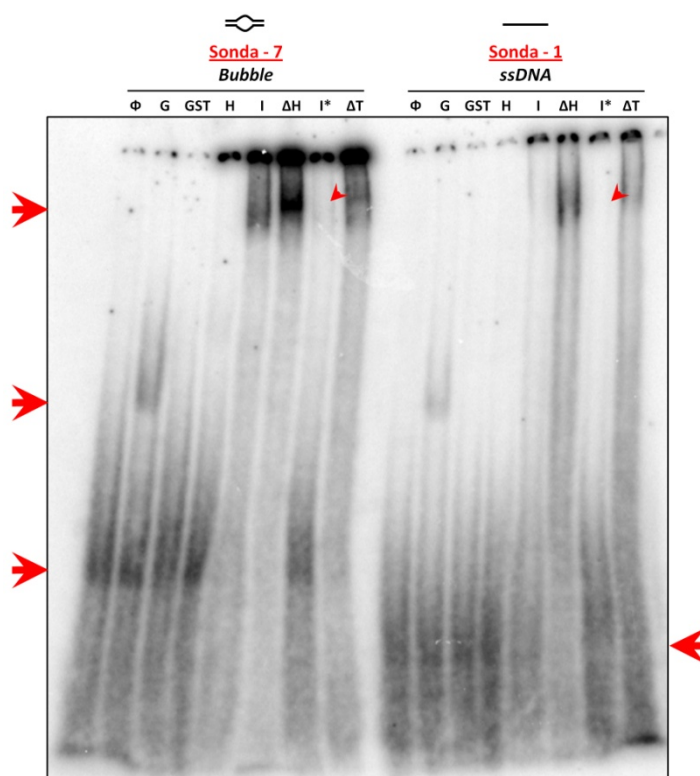
**Figura 40 | Imágenes de microscopía electrónica de la unión al ADN de GST-IRIF.** (A) Proteína GST-IRIF en ausencia o en presencia de ADN (dsDNA inespecífico de  $\approx 800$  pb). La proteína aparece predominantemente formando multímeros ("Mul") y en pocos casos en forma monomérica ("Mon"). En presencia de ADN, se unió a éste formándose fibras ("F"), que incluso llegaron a contener multímeros de proteína. Micrografías con magnificación de 40.000 $\times$ . Barras de escala, 100 nm. (B) Detalle de los multímeros de GST-IRIF (zoom  $\times 4$ ). (C) Detalle de las fibras de GST-IRIF:ADN (zoom  $\times 2.5$ ).



La unión de la región IRIF al ADN se verificó por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se incubó la proteína GST-IRIF con un ADN bicatenario inespecífico (amplicón de PCR de  $\approx$  800 pb) y se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica para la proteína sin y con este ADN (Figura 40A). En ausencia de ADN, se observó cómo la proteína GST-IRIF se encuentra, mayoritariamente, formando multímeros (Figura 40B), con sólo unas pocas partículas monoméricas. En presencia de ADN, aunque se siguieron observando los multímeros, se visualizaron fibras de proteína unida a lo largo de la hebra de ADN (Figura 40C), e incluso los propios multímeros de proteína formando parte de dichas fibras. Conviene recordar que el ADN no se tiñó para microscopía electrónica, únicamente la proteína, por lo que las fibras sólo se hacen visibles en caso de que exista proteína unida a ellas recubriéndolas. Estos resultados confirman de manera visual nuestro hallazgo de que la región IRIF de 53BP1 se une al ADN de manera inespecífica.

#### 4.5. El mutante IRIF<sup>D1521R</sup> del dominio Tudor pierde la unión al ADN

Por último, para tratar de identificar la región responsable de la unión de IRIF al ADN, se realizaron ensayos EMSA con todas las proteínas incubadas con las sondas *Bubble* (estructura característica para la que IRIF presentó mayor afinidad) y *ssDNA* (dado que nuestra hipótesis de partida era que 53BP1 podría unirse en concreto a *ssDNA*) (Figura 41). Curiosamente, únicamente el mutante puntual D1521R del dominio Tudor (proteína GST-IRIF\*) perdió prácticamente por completo la unión a ambos ADNs. Por su parte, la unión de GST-IRIF se mantuvo en los mutantes  $\Delta$ HOD (GST-IRIF  $\Delta$ HOD) y  $\Delta$ Tudor (GST-IRIF  $\Delta$ Tudor), siendo incluso más fuerte (mayor intensidad de la banda de retraso electroforético) en GST-IRIF  $\Delta$ HOD. Siguió sin detectarse unión para GST-HOD-SSDB, al igual que en los controles negativos GST y sin proteína. También se detectó la unión al



**Figura 41 | Ensayos EMSA con todas las proteínas generadas.** Imagen digitalizada de la autorradiografía obtenida. En todos los casos se incubaron 2  $\mu$ g de proteína. Se usaron las sondas *Bubble* y *ssDNA*.  $\Phi$  = Sin proteína; G = Complejo GINS; H = GST-HOD-SSDB; I = GST-IRIF;  $\Delta$ H = GST-IRIF  $\Delta$ HOD; I\* = GST-IRIF<sup>D1521R</sup>;  $\Delta$ T = GST-IRIF  $\Delta$ Tudor. Las flechas grandes laterales señalan las bandas (inferiores: bandas de las sondas; media: banda de retraso electroforético de GINS; superior: bandas de retraso electroforético de las demás proteínas). Únicamente el mutante puntual GST-IRIF<sup>D1521R</sup> perdió la interacción de IRIF con ambas sondas (flechas rojas pequeñas), que fue incluso más fuerte en el mutante GST-IRIF  $\Delta$ HOD.

ADN del complejo GINS, control positivo. Las uniones a la estructura burbuja fueron en todos los casos más fuertes que a ssDNA, dadas las mayores intensidades de sus bandas de retraso electroforético.

El hecho de que la unión al ADN de GST-IRIF no se pierda en el mutante  $\Delta$ HOD, unido a la ausencia de interacción del péptido HOD-SSDB, podría indicar que nuestra región candidato realmente no presenta actividad de unión al ADN. Más inquietante aún si cabe resulta la pérdida de la unión al ADN en el mutante puntual IRIF\*<sup>D1521R</sup>, pero no en el IRIF  $\Delta$ Tudor, a pesar de tener todo el dominio delecionado. Estas cuestiones se abordarán convenientemente en el apartado correspondiente de la sección destinada a la Discusión.

Además, se trataron de analizar por microscopía electrónica las uniones al ADN del resto de proteínas, pero debido a su alto índice de oligomerización (incluso en GST-IRIF  $\Delta$ HOD, que supuestamente no debería oligomerizar por la ausencia de este dominio) los resultados no resultaron concluyentes. Ni siquiera mediante filtración en gel/FPLC se consiguió obtener la proteína sin oligómeros de alto peso molecular, y ésta incluso se perdía en el proceso.

## **PARTE II: Identificación y caracterización de una respuesta al daño en el ADN asociada a citocinesis**

### **1. Identificación de una DDR activa en el *midbody***

Como ya se ha señalado al final de la Parte I, nuestras últimas investigaciones centradas en 53BP1 y su modo de unión a las DSBs nos llevaron a considerar un posible papel de esta proteína en reconocimiento de ssDNA y, por extensión, en la respuesta a estrés replicativo. El reanálisis de ciertas tinciones inmunofluorescentes de 53BP1 y de la proteína de unión a ssDNA RPA obtenidas en nuestro laboratorio apoyaba esta idea. En concreto, se observó un patrón de localización de estas proteínas muy característico que adoptaba la forma de puentes internucleares conectando células interfásicas, en el cual RPA se localizaba en una zona central de la que partían ambas ramas de 53BP1 constituyendo un finísimo puente. La presencia de RPA hizo pensar que podría estar uniéndose a ssDNA, por lo que 53BP1, localizada a ambos lados, estaría unida a las interfases de ssDNA/dsDNA. Esta visión es consistente con el hecho conocido de que 53BP1 limita la resección del ADN y el avance del ssDNA generado.

El segundo proyecto de investigación presentado en esta tesis doctoral nace precisamente de los estudios realizados en torno a dichos resultados de inmunofluorescencia de 53BP1 y RPA. Como punto de partida, se pensó en una estructura celular similar a la observada: El *midbody*, estructura característica de la citocinesis. Posiblemente, el *midbody* podría guardar alguna relación con las estructuras citológicas halladas y estar implicado en algún mecanismo de la DDR no descrito previamente en el cual 53BP1 podría desempeñar alguna nueva función. Así pues, nuestra investigación tuvo como inicio el estudio del *midbody*.

#### **1.1. Una DDR activada se localiza en el *midbody*: La mDDR**

El primer paso de nuestros estudios en torno al *midbody* consistió en examinar la posible relación de éste con la DDR, analizando si ésta está activa de forma local en él y, por tanto, asociada a citocinesis. Para ello, se realizaron múltiples tinciones inmunofluorescentes en células U2OS (línea de osteosarcoma humano) y 3T3 (fibroblastos inmortalizados de ratón) de Aurora B (AURKB), usada como marcador característico de *midbodies*, con una batería de proteínas de la DDR (Figura 42). Se observó que la mayoría de los marcadores de la DDR analizados colocalizaron en mayor o menor extensión con Aurora B en el *midbody*. Dichas colocalizaciones aparecen recopiladas en la Tabla 12. Ciertas proteínas de la DDR presentaron una fuerte colocalización con el *midbody*, incluyendo como

proteínas flanqueantes del *midbody* a BRCA1, KAP1-S824P (forma activada en la DDR), SMC1-P (forma activada), CHK1-S345P (forma activada), PICH y MUS81; como proteína de la zona oscura no central a GEN1; y como proteína presente en la zona oscura central a RAD51. Otras proteínas de la DDR se localizaron en el *midbody* en menor medida o sólo en algunas ocasiones, incluyendo como proteína flanqueante y de la zona central a  $\gamma$ H2AX; y como flanqueantes a 53BP1, RPA, MMS21 y FANCD2. Por último, otras proteínas de la DDR no se detectaron en el *midbody*, como es el caso de CHK2-T68P (forma activada), BLM y FANCM.

Cabe resaltar que esta relación incluye proteínas presentes en los *midbodies* genéricos, observados en células mantenidas en cultivo durante 24 h. Aunque se observaron también en *midbodies* tempranos (de morfología “*punteada*”), su presencia es más destacada en los *midbodies* tardíos o persistentes (“*alargados*”). Destaca la presencia de los típicos marcadores de la DDR ( $\gamma$ H2AX, 53BP1, KAP1-S824P, SMC1-P), así como de proteínas relacionadas con recombinación homóloga (RPA, BRCA1, RAD51). Por su parte, la fuerte presencia de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 podría arrojar pistas sobre algún posible mecanismo de reparación asociado.

Estos resultados permitieron concluir que en el *midbody* existe una DDR activada de forma local, que se denominó DDR del *midbody* (mDDR, *midbody* DDR) o bien DDR asociada a citocinesis. Dada la implicación de este último proceso, se pensó que podría estar relacionada con el *checkpoint* de abscisión citocinética, disparado por Aurora B ante la presencia de puentes cromosómicos en citocinesis. Con ello, se formuló como hipótesis de trabajo que los *midbodies* persistentes se ensamblan en torno a ADN que persiste en un puente cromosómico entre dos células hijas independientes.

Proteína de la DDR	Localización en el <i>midbody</i>
BRCA1 KAP1-S824P SMC1-P CHK1-S345P RAD51 PICH MUS81 GEN1	++
$\gamma$ H2AX 53BP1 RPA MMS21 FANCD2	+
CHK2-T68P BLM FANCM	—

**Tabla 12 | Proteínas de la DDR localizadas en el *midbody*.** Se relacionan los resultados de colocalizaciones obtenidas por inmunofluorescencia entre diversas proteínas de la DDR y AURKB como marcador del *midbody*. Clave: ++, colocalización fuerte; +, colocalización débil u ocasional; —, ausencia de colocalización.



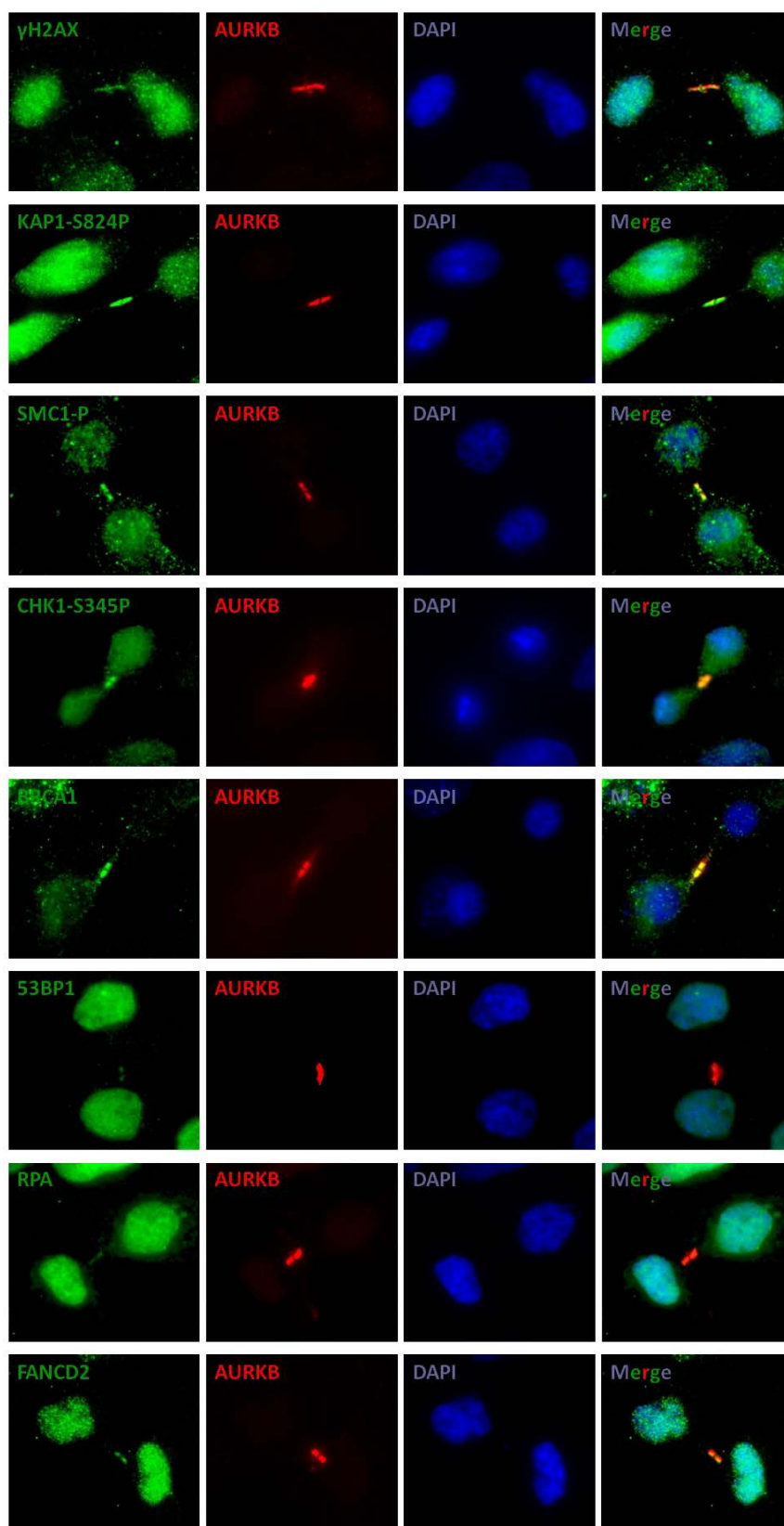
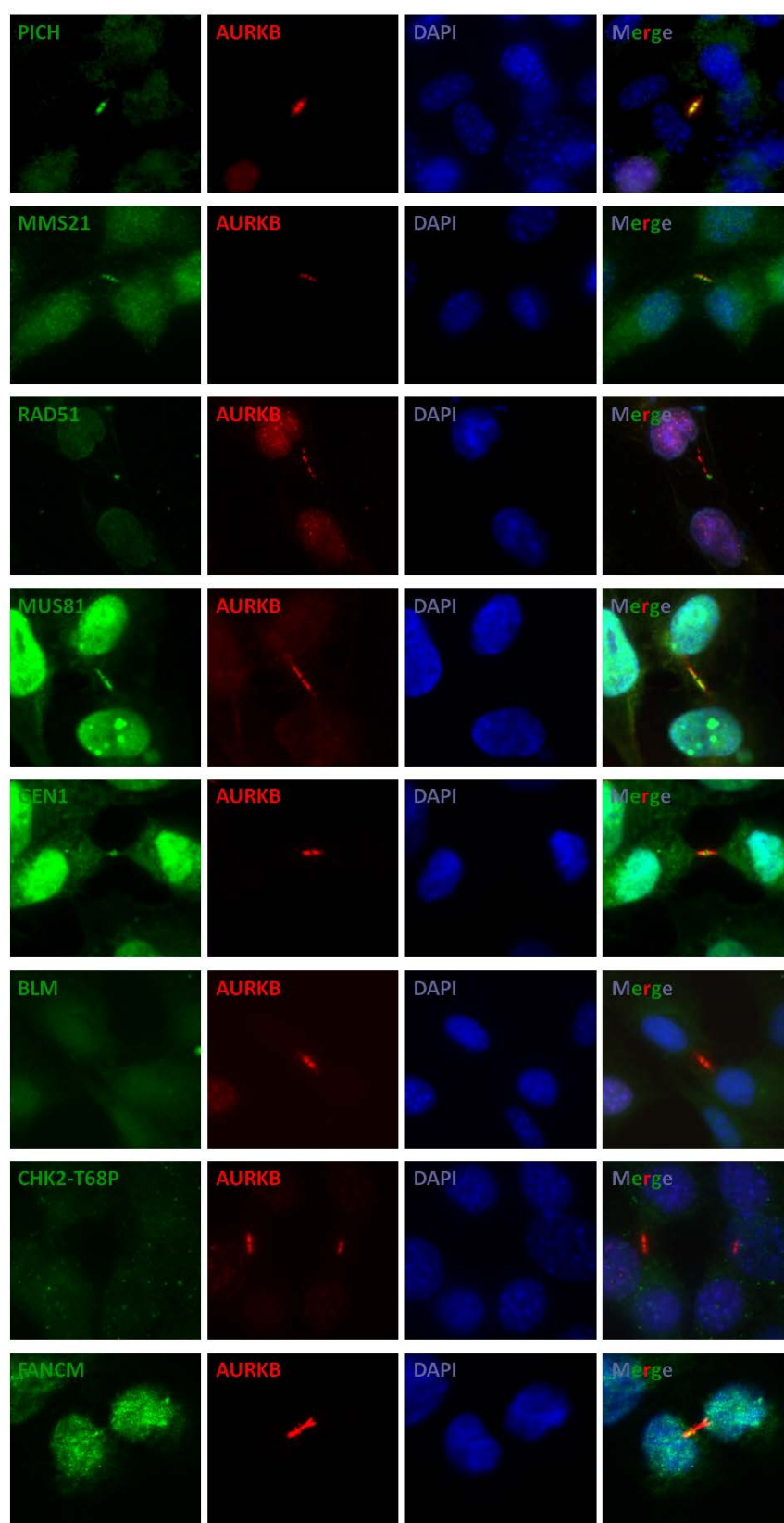


Figura 42 (Sigue en la página siguiente) | Colocalización de proteínas de la DDR con el *midbody*.

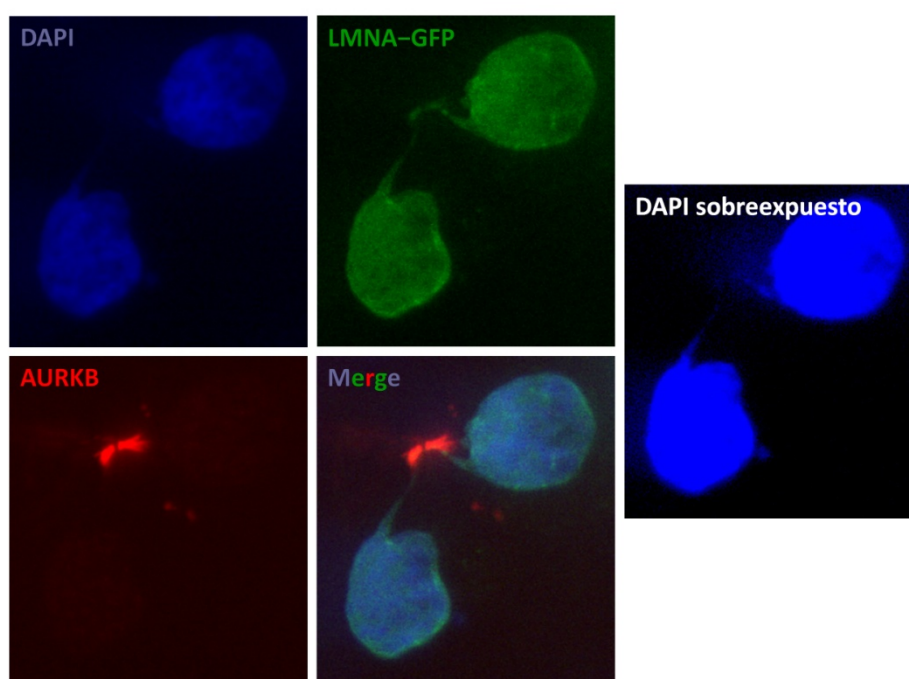


**Figura 42 (Continuación) | Colocalización de proteínas de la DDR con el *midbody*.** Tinciones inmunofluorescentes de proteínas de la DDR (verde) y AURKB (rojo) como marcador de *midbodies*, con los núcleos teñidos con DAPI (azul). Se fijaron células U2OS o 3T3 crecidas asincrónicamente durante 24 h. Tinciones en U2OS:  $\gamma$ H2AX, 53BP1, RPA, CHK1-S345P, FANCD2, RAD51, MUS81, GEN1, FANCM. Tinciones en 3T3: KAP1-S824P, SMC1-P, BRCA1, PICH, MMS21, BLM, CHK2-T68P.

## 1.2. Los *midbodies* tienden a contener ADN

Identificada una DDR asociada al *midbody*, el siguiente paso lógico fue comprobar si éste contiene ADN sobre el cual pueda ejecutarse aquélla. Con tal propósito, se realizaron observaciones y recuentos en células U2OS teñidas con Aurora B como marcador de *midbodies* y con DAPI para detectar el ADN. Ante la posibilidad de que el posible ADN localizado en los *midbodies* pudiera ser difícilmente detectable, se realizaron dichas tinciones en células previamente transfectadas con un plásmido codificante de LMNA–GFP, fusión con GFP de Lámina A (LMNA), proteína presente en la cara nucleoplásmica de la membrana nuclear interna y que, por tanto, sirve como marcador de ésta, lo que permite detectar posibles puentes de ADN cubiertos por ella de forma mucho más precisa que sólo con DAPI. Se detectó que  $\approx 10\pm 3$  % del total de *midbodies* contienen ADN, que discurre por ellos en forma de puente cromosómico. Su detección fue posible incluso únicamente con DAPI, aunque se vio facilitada con la sobreexposición de la señal de éste y con la fluorescencia emitida por LMNA–GFP (Figura 43).

El simple hecho de que exista una fracción de *midbodies* en los que se detecta fácilmente ADN de por sí da una idea de que esta estructura podría formarse en torno a puentes de ADN mal segregado entre dos células hijas independientes, sobre los que podría activar la mDDR de forma localizada.



**Figura 43 | *Midbody* conteniendo ADN.** Tinción inmunofluorescente de *midbodies* (marcados con AURKB, rojo) y ADN (con DAPI, azul) de células U2OS previamente transfectadas con un plásmido codificante de LMNA–GFP (verde), marcador de membrana nuclear interna. Puede observarse un puente cromosómico marcado con DAPI y LMNA–GFP entre las dos células hijas, discurriendo a través del *midbody*. La sobreexposición de la señal del DAPI facilita la observación. Se cuantificó que  $\approx 10\pm 3$  % del total de *midbodies* contienen ADN, en 3 análisis independientes de 300 *midbodies* cada uno.

### 1.3. El *midbody* se ve afectado por tratamientos farmacológicos que inducen inestabilidad genómica

Para tratar de verificar la posibilidad de que el *midbody* pudiera actuar como una estructura con capacidad de responder ante daño en el ADN, nos basamos en la hipótesis de que los puentes anafásicos generados de forma natural en la mitosis celular evolucionarían en citocinesis hacia puentes cromosómicos que darían lugar al ensamblaje de un *midbody* normal, desde el que se activaría la mDDR para resolverlos. Bajo esta premisa, se aplicó el razonamiento de que, por tanto, tratamientos farmacológicos que induzcan puentes anafásicos o cualquier otra condición de inestabilidad genómica darían lugar a un *midbody* aberrante en cuanto a alguna de sus características (Figura 44A).

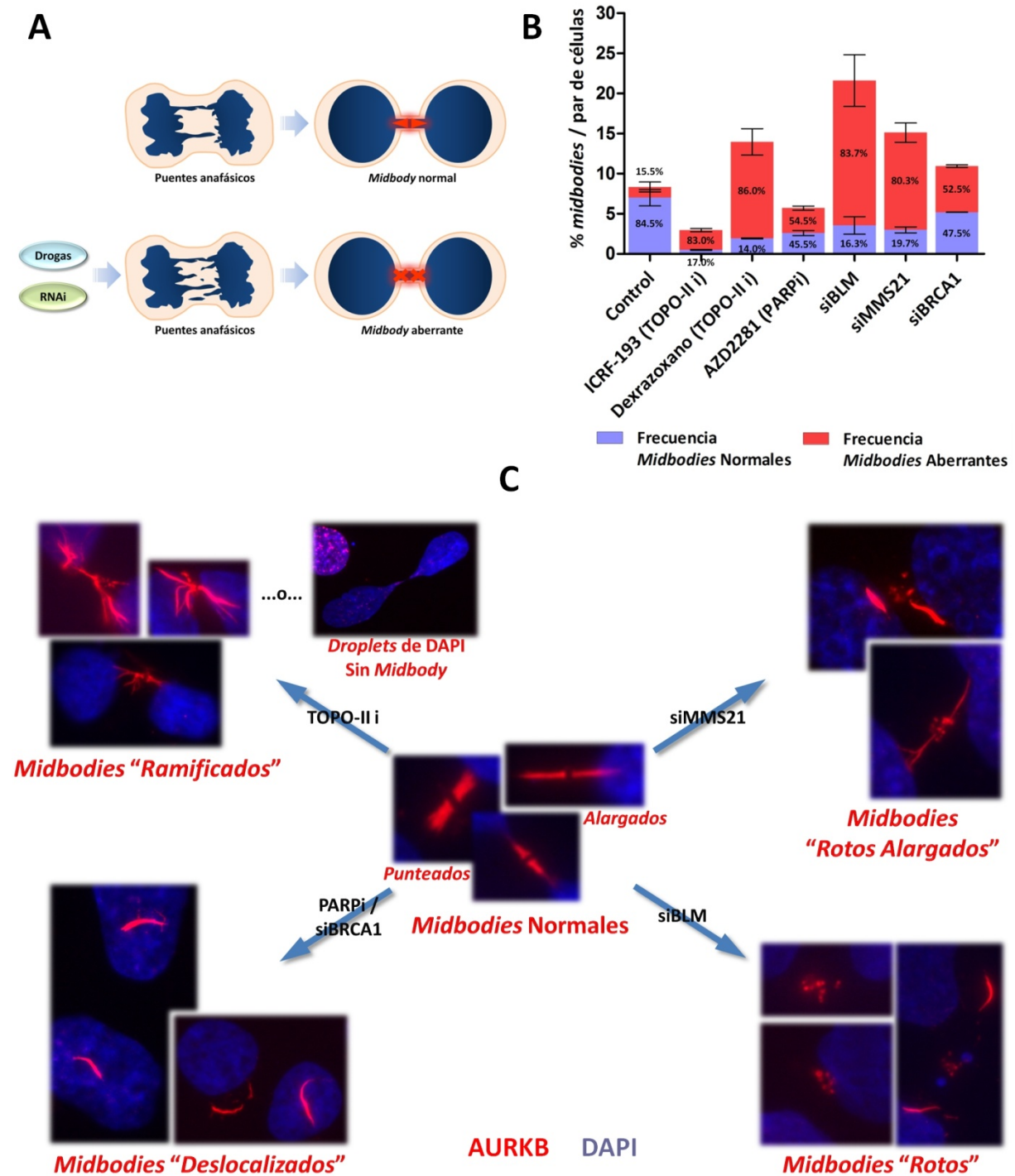
Tales experimentos fueron realizados en células U2OS en crecimiento exponencial, aplicando distintos tratamientos con drogas o con RNAi mediante siRNAs, y tiñendo después con DAPI y Aurora B. El patrón de tinción con Aurora B se usó en todo momento para detectar los *midbodies* y definir su morfología. De forma coherente con nuestra hipótesis, con todos los tratamientos se obtuvieron alteraciones en el *midbody*, tanto en su frecuencia de formación como en su morfología (Figura 44B). En una situación control, sin ningún tratamiento, la frecuencia de formación del *midbody* respecto al par de células se estimó del  $8.35 \pm 1.63$  %. De este porcentaje, la mayoría (84.5%) son *midbodies* normales, mientras que una minoría (15.5%) son *midbodies* aberrantes en cuanto a su morfología. Como puede observarse en la gráfica de la Figura 44B, todos los tratamientos inductores de inestabilidad genómica aplicados alteraron esta relación, aumentando considerablemente la frecuencia de *midbodies* aberrantes (50-85%) respecto a la de los normales (15-50%). Por otra parte, ciertos tratamientos indujeron una disminución en la frecuencia de ensamblaje de *midbodies* totales (2.5-6%), como es el caso del ICRF-193 (inhibidor de TOPO-II, TOPO-IIi) y del AZD2281 (inhibidor de PARP, PARPi), aunque esta reducción podría relacionarse más bien con una disminución de la proliferación celular. Otros tratamientos dieron lugar a un aumento en la frecuencia de *midbodies* totales (12-25%), tales como el dexrazoxano (otro inhibidor de TOPO-II, más potente que el anterior) y los siRNAs contra BLM, MMS21 y BRCA1.

De forma interesante, se observó que determinados tratamientos inductores de inestabilidad genómica dan lugar, de forma específica y mayoritaria, a ciertos *midbodies* aberrantes concretos (Figura 44C). Se consideraron *midbodies* aberrantes aquéllos que presentaron notables alteraciones estructurales con respecto a los *midbodies* normales. Los *midbodies* normales pueden ser tempranos (“*punteados*”, con ramas cortas similares a dos puntos) o tardíos (“*alargados*”, con ramas que se alargan debido a la separación progresiva de las células hijas, considerados *midbodies* persistentes, con frecuencia estimada de  $\approx 60 \pm 10$  % del total de *midbodies*). Por su parte, los *midbodies* aberrantes obtenidos se clasificaron en los siguientes tipos (Figura 44C):

- *Midbodies “ramificados”*: Obtenidos de forma específica con los tratamientos con inhibidores catalíticos de TOPO-II (ICRF-193 y dexrazoxano), especialmente a tiempo 24 h. Se originaron en el 83% del total de *midbodies* en el primer caso, y en el 86% en el segundo. La estructura del *midbody* está desorganizada, presentando múltiples ramas con ramificaciones. Con estos tratamientos, generalmente a tiempos mayores (48 h), se obtuvieron también unos puentes cromosómicos muy evidentes al DAPI y carentes de *midbody*, las denominadas *droplets* (“gotitas”), relacionadas con defectos de segregación cromosómica.
- *Midbodies “rotos”*: Generados de forma específica con RNAi contra la helicasa BLM (siBLM), en el 83.7% de los *midbodies*. Las ramas del *midbody* se hallan totalmente dismanteladas, adoptando la forma de multitud de residuos punteados, en ocasiones localizados en una zona central muy distante de dos ramas lejanas. Se encontraron en muchos casos asociados a micronúcleos.
- *Midbodies “rotos alargados”*: Se obtuvieron de forma específica con RNAi contra MMS21 (siMMS21), en el 80.3% de los *midbodies*. MMS21 (NSMCE2) es una E3-SUMO ligasa del complejo SMC5–SMC6, similar a los de cohesinas y condensinas, implicado en reparación de DSBs mediante HR (Potts y Yu, 2005; Potts *et al.*, 2006) y requerido para la cohesión entre cromátidas hermanas durante prometafase y progresión mitótica (Behlke-Steinert *et al.*, 2009). Estos *midbodies* aberrantes son una variante de los “rotos”, posiblemente con menor grado de alteración, en la que aparecen dos ramas alargadas conectadas por una zona de residuos punteados. Frecuentemente, se asociaron a la presencia de micronúcleos.
- *Midbodies “deslocalizados”*: Aparecieron de forma específica con el tratamiento con PARPi, en el 54.5% del total de *midbodies*, o con RNAi contra BRCA1 (siBRCA1), en el 52.5%. Las dos ramas del *midbody* son alargadas y curvas, pero se encuentran deslocalizadas, separadas a mucha distancia entre sí y de la zona de abscisión.

Esta clasificación pone de manifiesto la especificidad con que se altera el *midbody* dependiendo de cómo se inhiba la reparación del ADN. Parece ser que Aurora B dirigiría la formación del *midbody* de acuerdo con los defectos generados en el ADN, lo cual subrayaría la existencia de una mDDR asociada a citocinesis y orquestada por Aurora B, y asignaría al *midbody* una función reparadora. Esto resulta lógico teniendo en cuenta el papel de Aurora B como activador del *checkpoint* de abscisión citocinética, el cual implicaría la reparación de los puentes cromosómicos entre las dos células hijas por mecanismos previamente no descritos que podrían estar relacionados con la mDDR descubierta. La caracterización de dicha mDDR, así como su posible mecanismo principal, son cuestiones que se abordarán en los siguientes apartados.





**Figura 44 | Alteración del *midbody* por tratamientos que inducen inestabilidad genómica. (A)** Fundamento de la alteración del *midbody*. En condiciones normales, los puentes anafásicos generarían *midbodies* normales. Tratamientos con drogas o RNAi de ciertas proteínas de la DDR inducirían la aparición de más puentes anafásicos, lo que generaría *midbodies* aberrantes. **(B)** Frecuencias de *midbodies* normales en comparación con las de *midbodies* aberrantes obtenidas con estos tratamientos aplicados a células U2OS. La RNAi se llevó a cabo con siRNAs previamente validados por nuestro laboratorio, sembrándose las células 48 h post-transfección y analizándose tras 24 h. Los tratamientos con drogas se añadieron sobre células en fase exponencial de crecimiento durante 24 h. Concentraciones de uso: ICRF-193, 5  $\mu$ M; dexrazoxano, 100  $\mu$ M; AZD2281, 1  $\mu$ M. El análisis de *midbodies* se llevó a cabo por inmunofluorescencia de AURKB y DAPI, contabilizándose 250 *midbodies* en 3 réplicas independientes y calculándose las frecuencias como porcentaje de *midbodies* por par de células. **(C)** *Midbodies* aberrantes inducidos por inestabilidad genómica. Se muestran ejemplos de las distintas categorías generadas a partir de los normales específicamente según el tratamiento. Los *midbodies* aparecen marcados con tinción de AURKB (rojo) junto a sus núcleos en DAPI (azul).

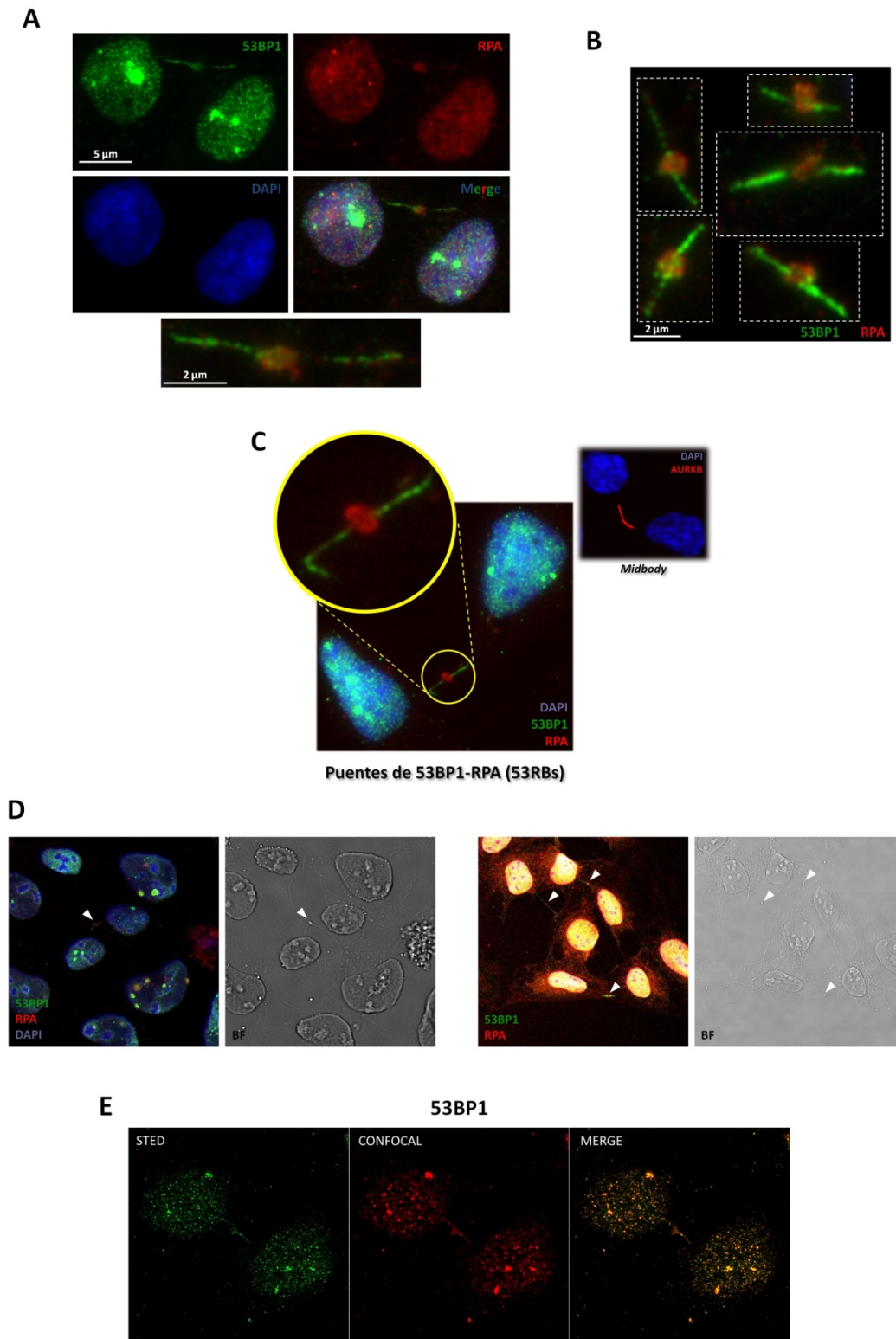
## 2. Caracterización de los puentes de 53BP1-RPA (53RBs) como consecuencia de la mDDR

### 2.1. Puentes de 53BP1-RPA (53RBs): Una nueva estructura celular entre dos células hijas

Tratando de buscar marcadores característicos de la mDDR, se retomaron los resultados iniciales de inmunofluorescencia de 53BP1 y RPA que mostraban patrones de localización similares al *midbody*. Se definieron y optimizaron las condiciones experimentales para su obtención. En células U2OS, caracterizadas por altos niveles de estrés replicativo intrínseco, no sometidas a ningún tratamiento y en crecimiento exponencial tras un mínimo de 48 h en cultivo, se observaron por inmunofluorescencia (siguiendo el protocolo específico detallado en la sección de Materiales y Métodos) estas nuevas estructuras constituidas por las proteínas 53BP1 y RPA, las cuales se denominaron puentes de 53BP1-RPA (53RBs, *53BP1-RPA bridges*). Los 53RBs aparecen conectando núcleos interfásicos de dos células hijas independientes separadas (Figura 45A). Están constituidos por dos ramas generalmente largas de un finísimo puente de 53BP1 separadas por una zona central donde la concentración de ésta es menor pero en cambio aparece un acúmulo de RPA (núcleo o *core*) con la forma de un punto de gran tamaño (Figura 45B). La longitud total de un 53RB varía entre 2-10  $\mu\text{m}$  dependiendo del caso, siendo la media de  $\approx 6 \mu\text{m}$ . Cada rama de 53BP1 tiene una longitud media de  $\approx 2.5 \mu\text{m}$  y un espesor de 100-250 nm. La zona central de RPA presenta un diámetro medio de 0.5-2  $\mu\text{m}$ .

La frecuencia de aparición de 53RBs en células U2OS no tratadas se estimó en  $6.82 \pm 0.07$  % por par de células. Estas estructuras recuerdan a los *midbodies* persistentes, cuya frecuencia es equivalente, apareciendo un patrón de localización similar entre las ramas de 53BP1 y las de Aurora B (Figura 45C). El hecho de que sólo aparecieran en las células tras un mínimo de 48 h en cultivo, lo que serían 1-2 ciclos celulares completos, hizo presagiar que para su formación se requiere, por una parte, cierta acumulación de daño (hipotéticamente, estrés replicativo endógeno, ya que las células no se sometieron a ningún tratamiento), así como la formación previa de un *midbody* que evolucione hacia su estadio tardío (persistente). Por ello, los 53RBs se consideraron marcadores de la mDDR a tiempos tardíos, siendo una consecuencia de ésta. Los 53RBs se formarían en los *midbodies* cuando el ADN dañado siendo reparado en ellos resulta ser persistente. Conceptualmente, podrían considerarse como “cicatrices” de una lesión del ADN todavía siendo reparada en el *midbody*.

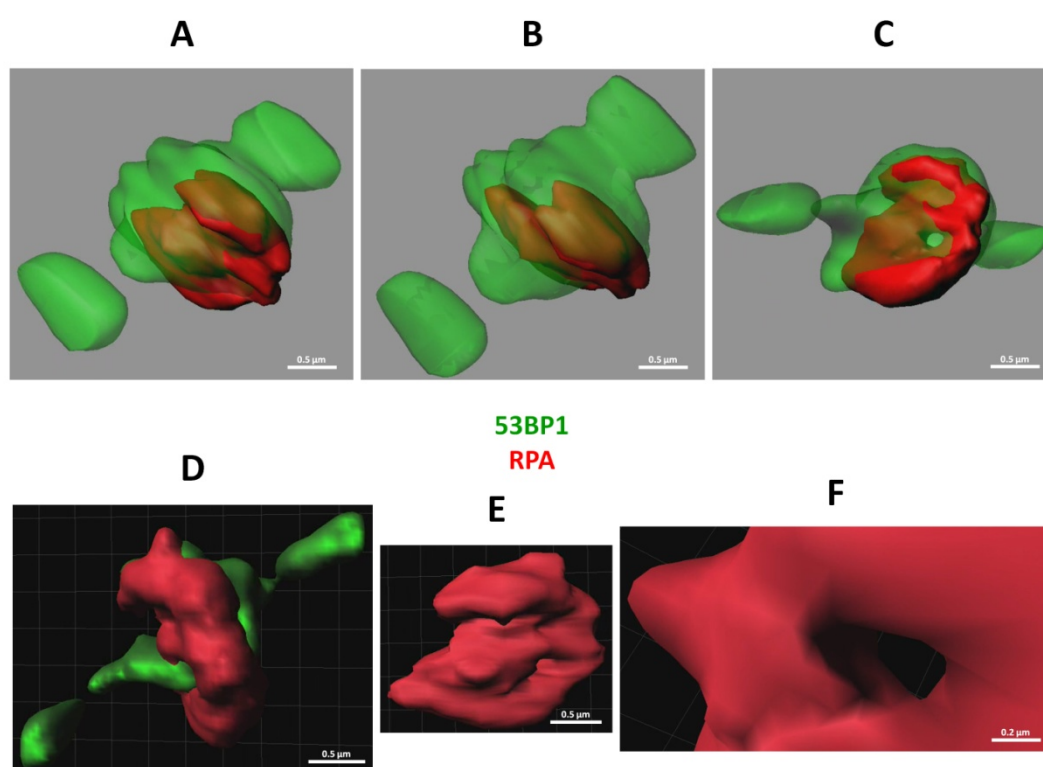
Un examen más detallado de los 53RBs reveló que por microscopía óptica son citológicamente distinguibles incluso al campo claro, apreciándose un par de líneas marcadas correspondientes a las ramas de 53BP1, en ocasiones incluidas en extensiones citoplasmáticas a modo de puentes intercelulares, y la zona central de RPA a modo de gránulo birrefringente protuberante (Figura 45D). Al microscopio confocal de súper-resolución (STED) se observó que 53BP1 forma algunos acúmulos lineales en las ramas del puente y diminutos microfocos tanto en éstas como en la zona central de RPA (Figura 45E).



**Figura 45 | Puentes de 53BP1-RPA (53RBs).** (A) Tinción inmunofluorescente de 53RBs, donde se aprecian conectando núcleos de células interfásicas separadas y se muestra uno de ellos en detalle. Se efectuó según el protocolo detallado en la sección de Materiales y Métodos. 53BP1, verde; RPA, rojo; núcleos, azul (DAPI). Barras de escala, 5  $\mu$ m y 2  $\mu$ m. (B) Detalle de varios ejemplos de 53RBs, obtenidos de la tinción anterior. Barra de escala, 2  $\mu$ m. (C) Similitud entre los 53RBs (53BP1, verde; RPA, rojo) y el *midbody* persistente (AURKB, rojo). Núcleos teñidos con DAPI (azul). (D) Inmunofluorescencia de 53RBs (indicados con flechas) mostrando también el campo claro (BF, *bright field*), al cual también son distinguibles, especialmente por la protuberancia de la zona central de RPA. (E) Observación de 53BP1 en un 53RB por microscopía de súper-resolución (STED). Se comparan las imágenes de ésta y del modo confocal convencional, apreciándose más detalladamente la disposición de la proteína.



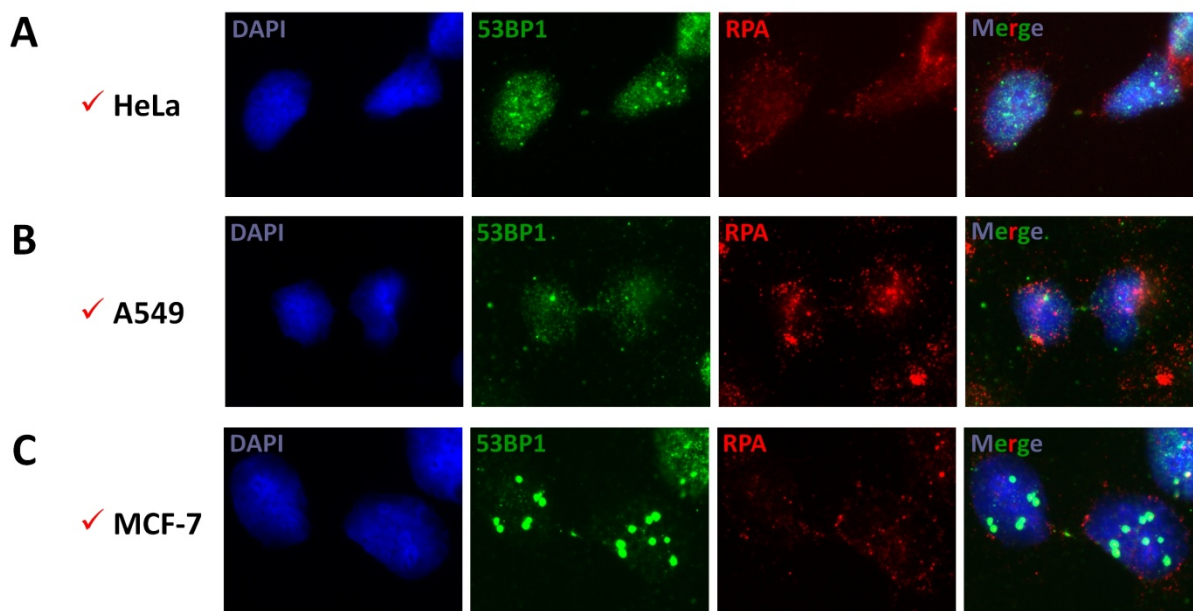
Tratando de caracterizar con mayor detalle la estructura de los 53RBs, se realizó una reconstrucción 3D de éstos usando proyecciones en Z (montaje Z-stack) de las anteriores tinciones inmunofluorescentes, obtenidas al microscopio confocal de láser de luz blanca (WLL) (Figura 46 y videos *53BP1-RPA Bridges - 3D Reconstruction (Z-Stack) - 1.mpg* y *53BP1-RPA Bridges - 3D Reconstruction (Z-Stack) - 2.mpg* del Anexo I). Analizando en detalle el núcleo de RPA, se observó en éste la presencia de un canal central de  $\approx 170$  nm de diámetro medio en el cual podría alojarse el ssDNA unido a esta proteína. En este modelo, 53BP1 se localizaría en las interfases de ssDNA/dsDNA, posiblemente limitando la extensión del ssDNA.



**Figura 46 | Reconstrucción 3D de un puente de 53BP1-RPA (53RB).** Se obtuvo a partir de diferentes secciones de un montaje en Z (Z-stack) obtenido por microscopía confocal de tinciones inmunofluorescentes de 53RBs. 53BP1, verde; RPA, rojo. **(A)** Vista isométrica de la estructura. **(B)** Vista cenital. **(C)** Detalle del canal central atravesando el núcleo de RPA. **(D)** Vista diagonal, mostrando el espesor de las ramas de 53BP1 (100-250 nm). **(E)** Núcleo central de RPA. **(F)** Orificio del canal central del núcleo de RPA ( $\varnothing \approx 170$  nm). Barras de escala, 0.5 µm y 0.2 µm.

Todos estos estudios se realizaron en células U2OS (línea de osteosarcoma humano). Se trataron de detectar los 53RBs en otras líneas celulares aplicando el mismo protocolo que para U2OS. En células HeLa (línea de cáncer de ovario humano) (Figura 47A), los 53RBs se forman pero resultan ser vestigiales, con morfología punteada en algunos casos y colocalización apreciable entre 53BP1 y RPA. En células A549 (línea de adenocarcinoma pulmonar humano) (Figura 47B), los 53RBs son de morfología más acortada que los de U2OS, pero la zona central de RPA es más pequeña y se hace menos visible. En células MCF-7 (línea de adenocarcinoma de mama humano) (Figura 47C), los

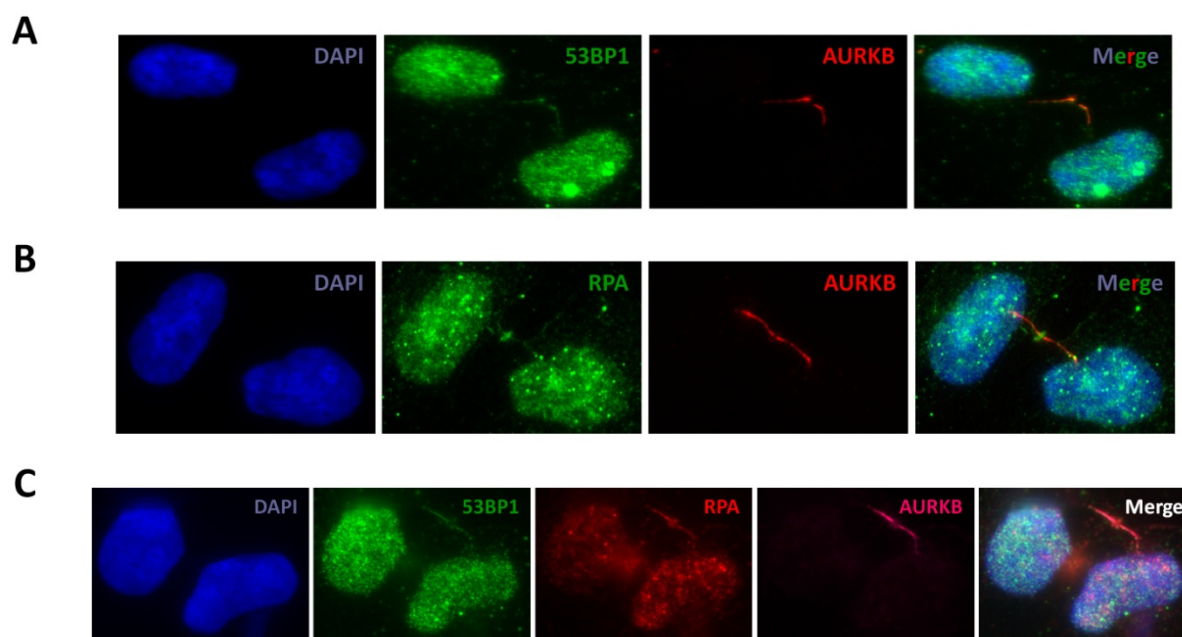
53RBs son similares a los anteriores. No se observaron 53RBs en células 3T3 (línea de fibroblastos de ratón inmortalizados). En resumen, los 53RBs sólo se detectaron en varias líneas tumorales humanas. La menor presencia de RPA en las otras tres líneas en comparación con U2OS podría deberse a la mayor carga de estrés replicativo intrínseco de estas últimas. Dado que se obtuvieron mejores resultados en U2OS, ésta será la línea usada en lo sucesivo.



**Figura 47 | 53RBs en otras líneas celulares diferentes a U2OS.** Se aplicó el mismo protocolo experimental que para U2OS. 53BP1, verde; RPA, rojo; núcleos, azul (DAPI). **(A)** En HeLa, morfología más punteada. **(B)** En A549, más cortos y con menor densidad de RPA. **(C)** En MCF-7, similares a los anteriores.

## 2.2. Los 53RBs se localizan siempre en *midbodies* persistentes

Para confirmar nuestra hipótesis de que los 53RBs son estructuras asociadas a los *midbodies* persistentes, dada su analogía estructural con ellos, se efectuaron distintas tinciones inmunofluorescentes de 53RBs en células U2OS, aplicando además la tinción de Aurora B (resistente al tratamiento de pre-extracción) para detectar *midbodies*. Se encontró que, en todos los casos, los 53RBs colocalizaron con *midbodies* persistentes (tardíos, de morfología “*alargada*”). En concreto, las dos ramas de 53BP1 colocalizaron con las de Aurora B en el *midbody* persistente (Figura 48A). La zona central de RPA se localizó justo en el cuerpo troncal del *midbody*, abarcando tanto la protuberancia como la zona oscura completa (Figura 48B). Así pues, RPA es de las escasas proteínas localizadas en la zona oscura central del *midbody*, no sólo en la periferia de ésta. Estos resultados también se confirmaron con la triple inmunofluorescencia de 53BP1, RPA y Aurora B (Figura 48C). La localización de los 53RBs en *midbodies* persistentes los confirma, por tanto, como marcador de la mDDR tardía.



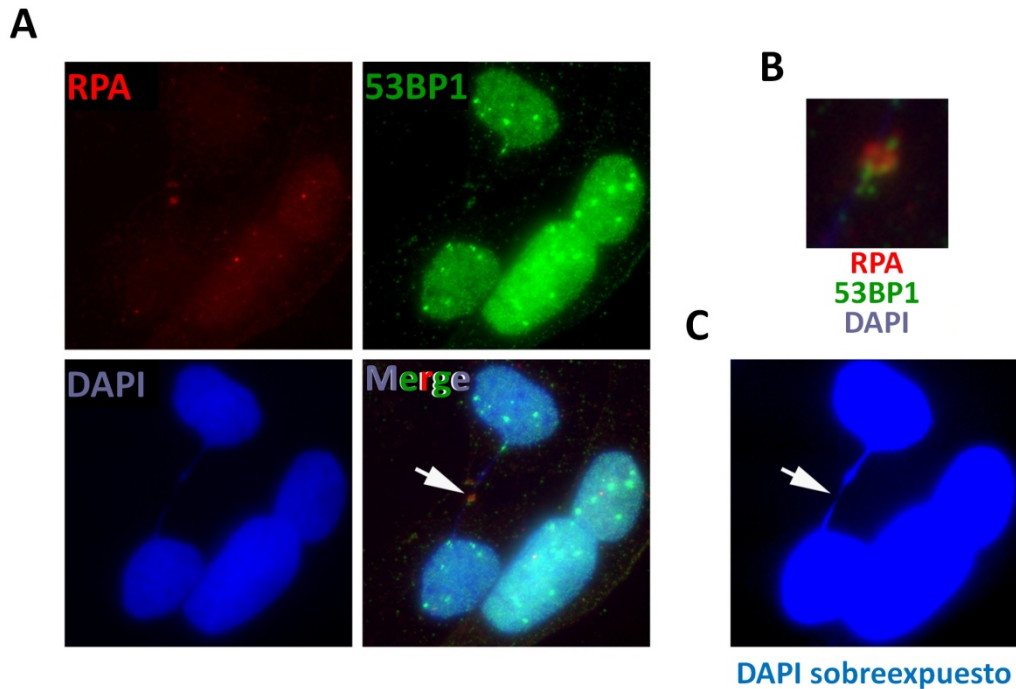
**Figura 48 | Colocalización de los 53RBs con *midbodies* persistentes.** Inmunofluorescencias en células U2OS aplicando el protocolo de detección de 53RBs, con los núcleos teñidos con DAPI (azul). **(A)** Tinción inmunofluorescente de 53BP1 (verde) y AURKB (rojo), mostrando la colocalización de la primera con los brazos del *midbody*. **(B)** Tinción inmunofluorescente de RPA (verde) y AURKB (rojo), mostrando la localización de la primera en todo el cuerpo troncal del *midbody*, incluida la zona oscura central. **(C)** Tinción inmunofluorescente de 53BP1 (verde), RPA (rojo) y AURKB (magenta), confirmando las localizaciones anteriores.

### 2.3. Los 53RBs tienden a contener puentes cromosómicos

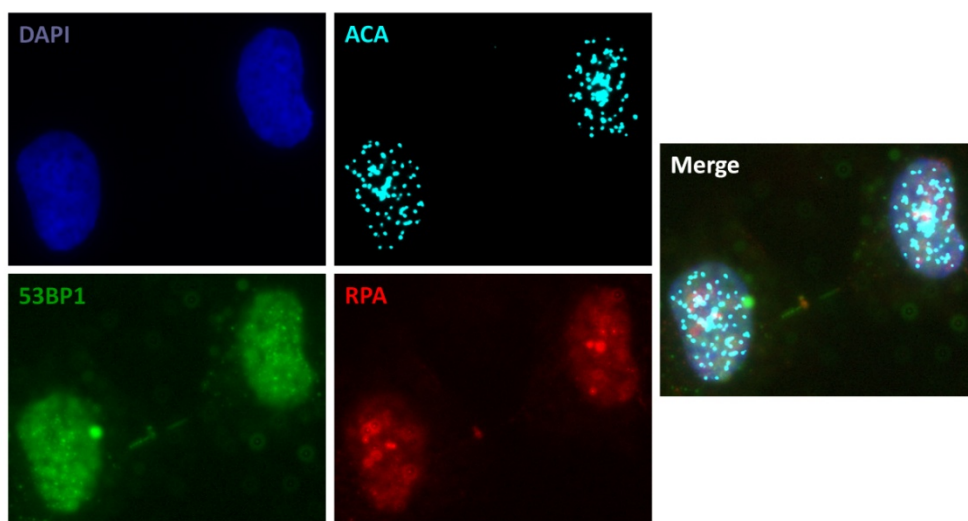
Al igual que ocurrió con el estudio del *midbody*, una vez descubierta la posible participación de los 53RBs en la DDR, el siguiente paso lógico fue demostrar la presencia en ellos de puentes cromosómicos de ADN sobre los que pudiera ejecutarse tal respuesta. Para ello, se analizaron las tinciones inmunofluorescentes de 53RBs poniendo especial énfasis en la detección en ellos de puentes cromosómicos marcados con DAPI. Se contabilizó que  $\approx 10 \pm 3$  % del total de 53RBs contienen puentes cromosómicos detectables por DAPI (Figura 49A). Éste indicaría la presencia de dsDNA, aunque no la de ssDNA, ya que el DAPI se une al surco menor del ADN, sólo presente en la estructura bicatenaria. Justo en el tramo donde el puente de DAPI se vuelve más tenue y llega a hacerse indetectable es donde se localiza la partícula central de RPA, que interrumpiría la señal del DAPI posiblemente debido a la presencia de ssDNA al que se uniría la proteína (Figura 49B). Tanto el puente cromosómico como el punto donde su señal se interrumpe, coincidente con RPA, fueron más fácilmente detectables aplicando sobre-exposición a la señal del DAPI (Figura 49C).

Para tratar de verificar si el ADN que contienen los 53RBs pudiera pertenecer a secuencias centroméricas, frecuentemente asociadas a los defectos de segregación y en ocasiones indetectables al DAPI, se detectaron los centrómeros en la inmunofluorescencia de 53RBs aplicando ACA (anticuerpo anti-centrómeros, *anti-centromere antibody*). La señal de éste se detectó en focos nucleares discretos,

pertenecientes a los centrómeros, pero en ningún caso apareció en los 53RBs, lo que permitió concluir que éstos no contienen centrómeros (Figura 50).



**Figura 49 | 53RB conteniendo ADN.** Tinción inmunofluorescente de 53RBs en células U2OS. 53BP1, verde; RPA, rojo; ADN, azul (DAPI). **(A)** Presencia de un puente cromosómico marcado con DAPI atravesando un 53RB (indicado por la flecha). Se cuantificó que  $\approx 10 \pm 3$  % del total de 53RBs contienen ADN, en 3 análisis independientes de 200 53RBs cada uno. **(B)** Vista detalle del 53RB atravesando el puente de DAPI justo por la zona más tenue de éste. **(C)** Sobreexposición de la señal del DAPI para facilitar la observación del puente cromosómico. La señal se ve interrumpida justo en el punto donde se aloja la zona central de RPA (marcado por la flecha), lo cual podría deberse a la presencia de ssDNA al que ésta estaría unida.

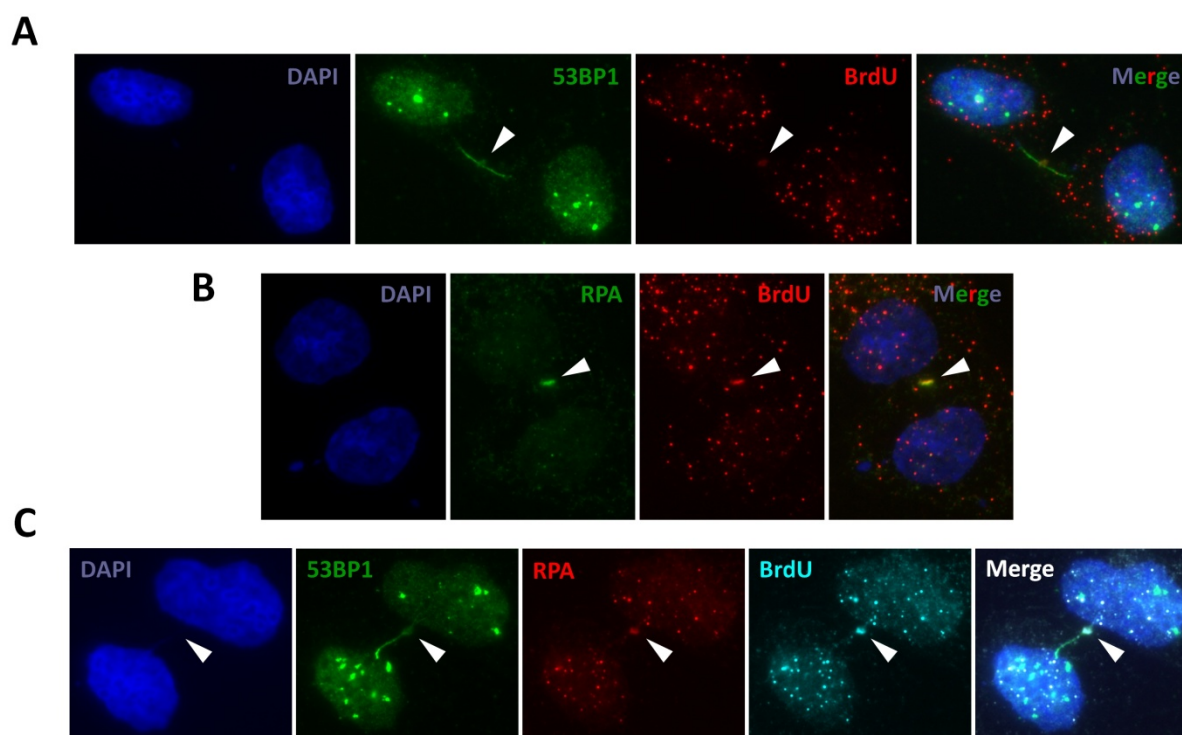


**Figura 50 | Los 53RBs no contienen centrómeros.** Tinción inmunofluorescente de 53RBs y centrómeros (ACA, anticuerpo anti-centrómeros) en células U2OS. 53BP1, verde; RPA, rojo; ACA, cian; ADN, azul (DAPI). Pueden observarse los puntos discretos de la señal de ACA, cada uno correspondiente a un centrómero. En ningún caso se detectó señal de ACA en los 53RBs.



## 2.4. Los 53RBs contienen ssDNA

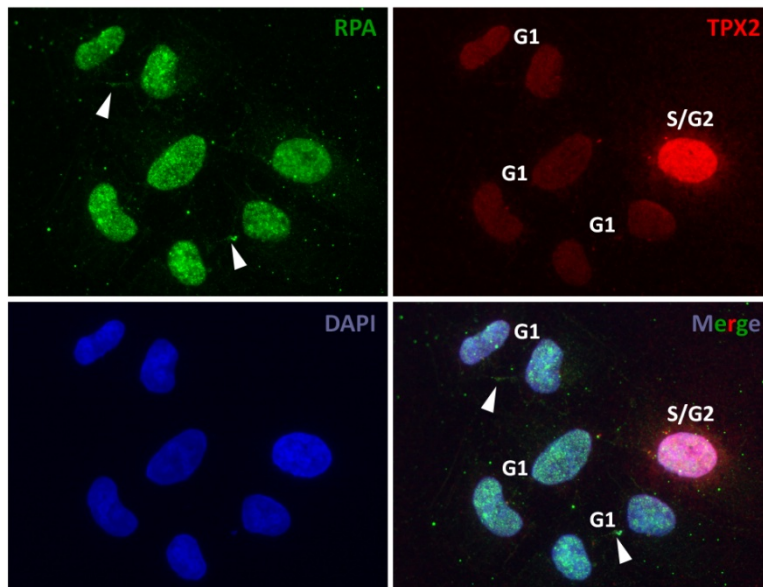
Aunque no en todos los 53RBs se detectó dsDNA por tinción con DAPI, la presencia en todos ellos de RPA, proteína de unión a ssDNA, hizo presagiar la posible presencia de ssDNA. Para confirmarlo, se realizó una tinción de ssDNA por etiquetado nativo con BrdU y se combinó con la inmunofluorescencia de 53RBs. Todos los 53RBs presentaron señal de BrdU, correspondiente a ssDNA, localizada justo en la zona central del 53RB, entre las dos ramas de 53BP1 (Figura 51A) y colocalizando con la zona central de RPA (Figura 51B), lo que indica que ésta se une a ese ssDNA. Esta localización se corresponde, por tanto, con la zona oscura central del *midbody*. El resultado se confirmó también con la triple inmunofluorescencia de 53BP1, RPA y BrdU (Figura 51C). Se demostró además que en los 53RBs que contienen puentes cromosómicos de DAPI (dsDNA) la señal de BrdU (ssDNA) se localiza en la zona donde se interrumpe la señal del DAPI (Figura 51C). La presencia de ssDNA en todos los 53RBs demuestra de forma completa su asociación con la mDDR, así como la propia existencia de ésta. Además, establece un posible vínculo con el estrés replicativo, caracterizado por la acumulación de ssDNA.



**Figura 51 | Los 53RBs contienen ssDNA.** Células U2OS fueron sometidas a un etiquetado nativo con BrdU, seguido de tinción inmunofluorescente de 53RBs aplicando también anticuerpo anti-BrdU, tiñendo los núcleos con DAPI (azul). La señal de BrdU marca únicamente las regiones de ssDNA, ya que, al no existir desnaturalización del ADN, son las únicas regiones accesibles al anticuerpo. **(A)** Inmunofluorescencia de 53BP1 (verde) y BrdU (rojo). Se detectó señal de BrdU en la zona central entre las dos ramas de 53BP1 de los 53RBs. **(B)** Inmunofluorescencia de RPA (verde) y BrdU (rojo). La señal de BrdU colocaliza con la de la zona central de RPA de los 53RBs. **(C)** Inmunofluorescencia de 53BP1 (verde), RPA (rojo) y BrdU (cian), confirmando las localizaciones descritas. Se aprecia además un puente cromosómico en el 53RB, con señal de DAPI interrumpida justo donde está la de BrdU y, por tanto, el ssDNA. Las flechas indican la zona correspondiente a la señal de BrdU en los 53RBs.

## 2.5. Los 53RBs están restringidos a fase G1

A fin de determinar en qué fases del ciclo celular se da la mDDR y por tanto se generan los 53RBs, se usó en la detección de éstos tinción inmunofluorescente de TPX2, marcador de fase S/G2. TPX2 es una proteína nuclear relacionada con la regulación del ciclo celular que actúa unida a la



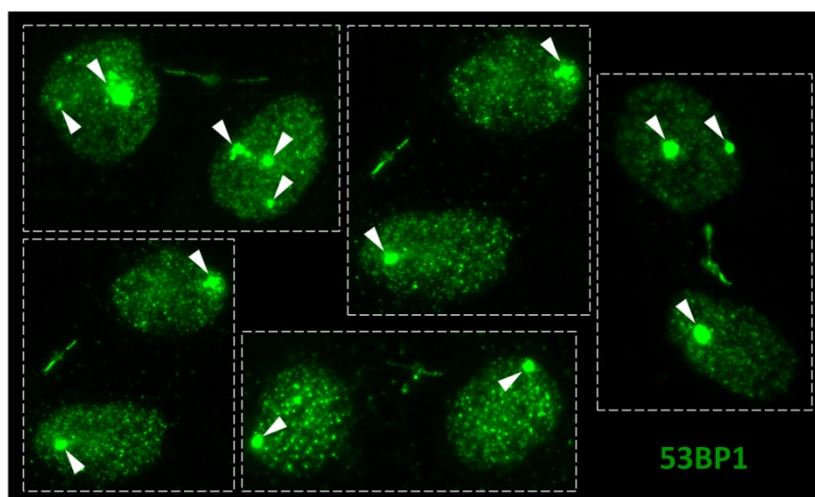
**Figura 52 | Los 53RBs sólo aparecen en fase G1.** Tinción inmunofluorescente de RPA (verde) y TPX2 (rojo), marcador de ciclo celular, aplicando el protocolo de detección de 53RBs en células U2OS. Los 53RBs se reconocieron por sus zonas centrales de RPA (señaladas con flechas) localizadas entre los núcleos, teñidos con DAPI (azul). Las células en G1 presentan una señal débil de TPX2, mientras que en las que están en S/G2 ésta es muy intensa. Todas las células interconectadas por 53RBs están en G1.

cromatina (por tanto, resiste el tratamiento de pre-extracción), manteniéndose en bajos niveles en fase G1 e incrementándose su concentración en S y G2. Por tanto, las células en G1 presentan una tinción débil de TPX2, que en cambio es muy intensa en células en S/G2. Se observó que los 53RBs, detectados por la presencia de sus zonas centrales de RPA, únicamente aparecieron en células en fase G1, con señal débil de TPX2 (Figura 52). Así pues, los 53RBs aparecen conectando núcleos interfásicos en G1, lo cual es coherente con su correspondencia con *midbodies* persistentes desde la citocinesis.

## 2.6. Los 53RBs siempre se forman entre células que contienen cuerpos nucleares de 53BP1 (53BP1 NBs)

Una observación interesante que se realizó al estudiar los 53RBs es que todos los núcleos que aparecen interconectados por ellos contienen cuerpos nucleares de 53BP1 (53BP1 NBs, también conocidos como dominios 53BP1-OPT), como se muestra en la Figura 53. Como ya se ha comentado (apartado 5.3 de la Introducción), los 53BP1 NBs se presentan como amplios focos de 53BP1 persistentes en G1, localizados de forma simétrica en los dos núcleos hijos, y relacionados con la protección de regiones genómicas expuestas a estrés replicativo. El hecho de que los 53RBs aparezcan en células con 53BP1 NBs es consistente con el resultado anterior donde se mostró que los 53RBs están restringidos a fase G1, ya que se ha descrito que los 53BP1 NBs están también confinados a fase G1 (Harrigan *et al.*, 2011; Lukas C. *et al.*, 2011).

Cabe puntualizar que los 53RBs y los 53BP1 NBs no aparecen en todas las células en G1, pero las células que los contienen siempre están en G1. No todas las células con 53BP1 NBs están interconectadas por 53RBs, pero éstos siempre aparecen en células que presentan 53BP1 NBs. Esto podría ser indicativo de alguna relación entre ellos, que podría descartarse si existieran células en G1 con 53RBs pero sin 53BP1 NBs, lo cual no se



**Figura 53 | Los 53RBs siempre interconectan células con 53BP1 NBs.** Tinción inmunofluorescente de 53RBs en células U2OS. Únicamente se muestra 53BP1 (verde). Los 53RBs se reconocieron como puentes intercelulares de 53BP1. Recopilación de ejemplos de núcleos interconectados por 53RBs, todos los cuales contienen 53BP1 NBs (señalados con flechas). Estos últimos aparecen como focos de gran tamaño, localizados generalmente de forma simétrica en dos núcleos hijos.

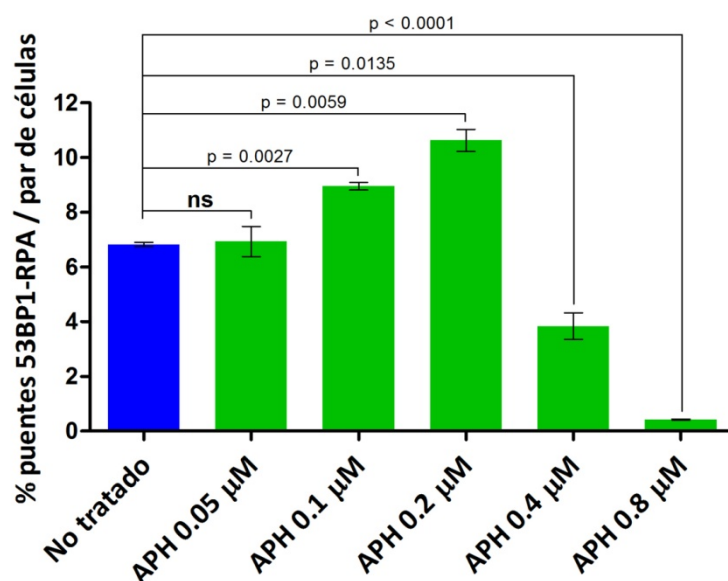
observó en ningún caso. Posiblemente, las lesiones del ADN contenidas en los 53BP1 NBs sean las mismas que las presentes en los 53RBs, salvo que en este último caso no se habrían segregado correctamente durante la división celular, disparando el *checkpoint* de abscisión y la mDDR asociada a éste.

## 2.7. La formación de 53RBs se induce por estrés replicativo leve

Dado que los 53RBs podrían ser estructuras relacionadas con los 53BP1 NBs e incluso constituir respuestas ante una misma lesión en el ADN, el nexo experimental común entre ambos podría venir dado por las condiciones que afectan a su formación. Se ha descrito que la formación de 53BP1 NBs se induce en condiciones de estrés replicativo leve, en concreto con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M (Lukas C. *et al.*, 2011). Para comprobar si esto mismo se cumple en los 53RBs, se aplicaron tratamientos con APH a concentraciones crecientes durante 24 h, tras lo cual se cuantificaron los 53RBs como porcentajes de 53RBs por par de células. Los resultados mostraron que la formación de 53RBs se induce en condiciones de estrés replicativo leve (Figura 54). Con APH 0.05  $\mu$ M no se observaron diferencias con el control no tratado, posiblemente porque a esta dosis tan baja no se genera estrés replicativo. A dosis mayores de APH (0.1  $\mu$ M y 0.2  $\mu$ M), se indujo de forma significativa y dosis-dependiente la formación de 53RBs con respecto al control no tratado. Se observó una mayor inducción de 53RBs ( $\approx 10.5\%$  frente a  $\approx 7\%$  en el control no tratado) en el tratamiento con APH 0.2  $\mu$ M, que es precisamente la dosis descrita como causante de estrés replicativo leve para la inducción de la generación de 53BP1 NBs (Lukas C. *et al.*, 2011). En cambio, dosis mayores de APH (0.4  $\mu$ M y 0.8  $\mu$ M) redujeron significativamente la formación de 53RBs, también de forma dosis-dependiente. Esto se debe a que



estas concentraciones se salen del rango de dosis que en células U2OS representa las condiciones de estrés replicativo leve, ya que si éste es fuerte las células detienen su proliferación al dispararse el *checkpoint* intra-S y por tanto no hay citocinesis ni *midbodies* ni 53RBs.



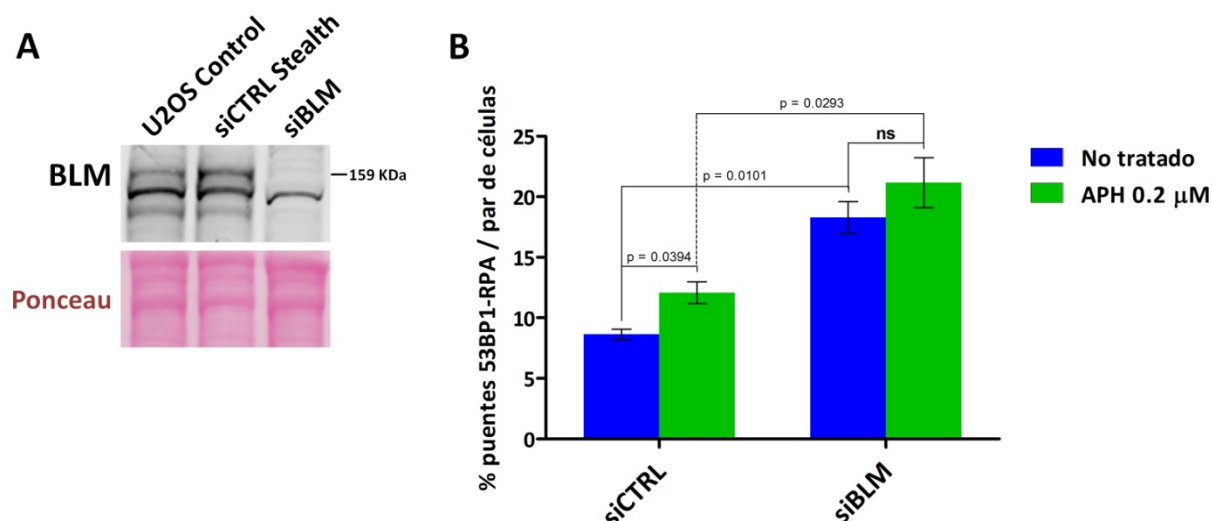
**Figura 54 | Inducción de la formación de 53RBs por estrés replicativo.**

Se trataron células U2OS mantenidas en cultivo durante 24 h con dosis crecientes de afidicolina (APH) durante otras 24 h, tras lo cual se fijaron y se tiñeron para la detección de 53RBs. Éstos se cuantificaron como porcentajes de 53RBs por par de células, contabilizándose 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. La formación de 53RBs se indujo de forma dosis-dependiente a concentraciones de APH que generan estrés replicativo leve, alcanzando un máximo a 0.2 µM. Dosis mayores tienen el efecto contrario, debido a la parada del ciclo celular ante estrés replicativo fuerte.

## 2.8. La formación de 53RBs se induce por la depleción de BLM

Otra de las condiciones descritas que incrementan la formación de 53BP1 NBs es la depleción de la helicasa BLM, ya que supone la eliminación de la vía de disolución (por el complejo BTR, BLM–TOPOIIIα–RMI1/2) para la reparación de las lesiones del ADN generadas por estrés replicativo (Lukas C. *et al.*, 2011). Para comprobar si los 53RBs responden del mismo modo a este estímulo, se deplecionó BLM en células U2OS mediante RNAi usando un siRNA contra esta proteína (siBLM), verificándose el *knock-down* por *Western blot* (Figura 55A). Tras ello, las células se dejaron crecer durante 48 h, aplicando tratamientos con APH 0.2 µM durante las últimas 24 h, a fin de comparar con la inducción de la formación de 53RBs debida al estrés replicativo leve. Los 53RBs se cuantificaron como porcentajes de 53RBs por par de células, mostrándose los resultados en la gráfica de la Figura 55B. La depleción de BLM ( $\approx 18\%$  53RBs por par de células) indujo la formación de 53RBs de forma significativa con respecto al control no silenciado y no tratado ( $\approx 8\%$ ). Esta inducción fue mayor que la ocasionada por el tratamiento con APH 0.2 µM en el control no silenciado ( $\approx 12\%$  53RBs por par de

células). En las células deplecionadas en BLM, las diferencias entre el control no tratado y el tratamiento con APH 0.2  $\mu\text{M}$  no llegaron a ser significativas. Esta pérdida del efecto de la APH podría deberse a que el ejercido por la depleción de BLM es más potente, siendo predominante y eclipsando al primero.

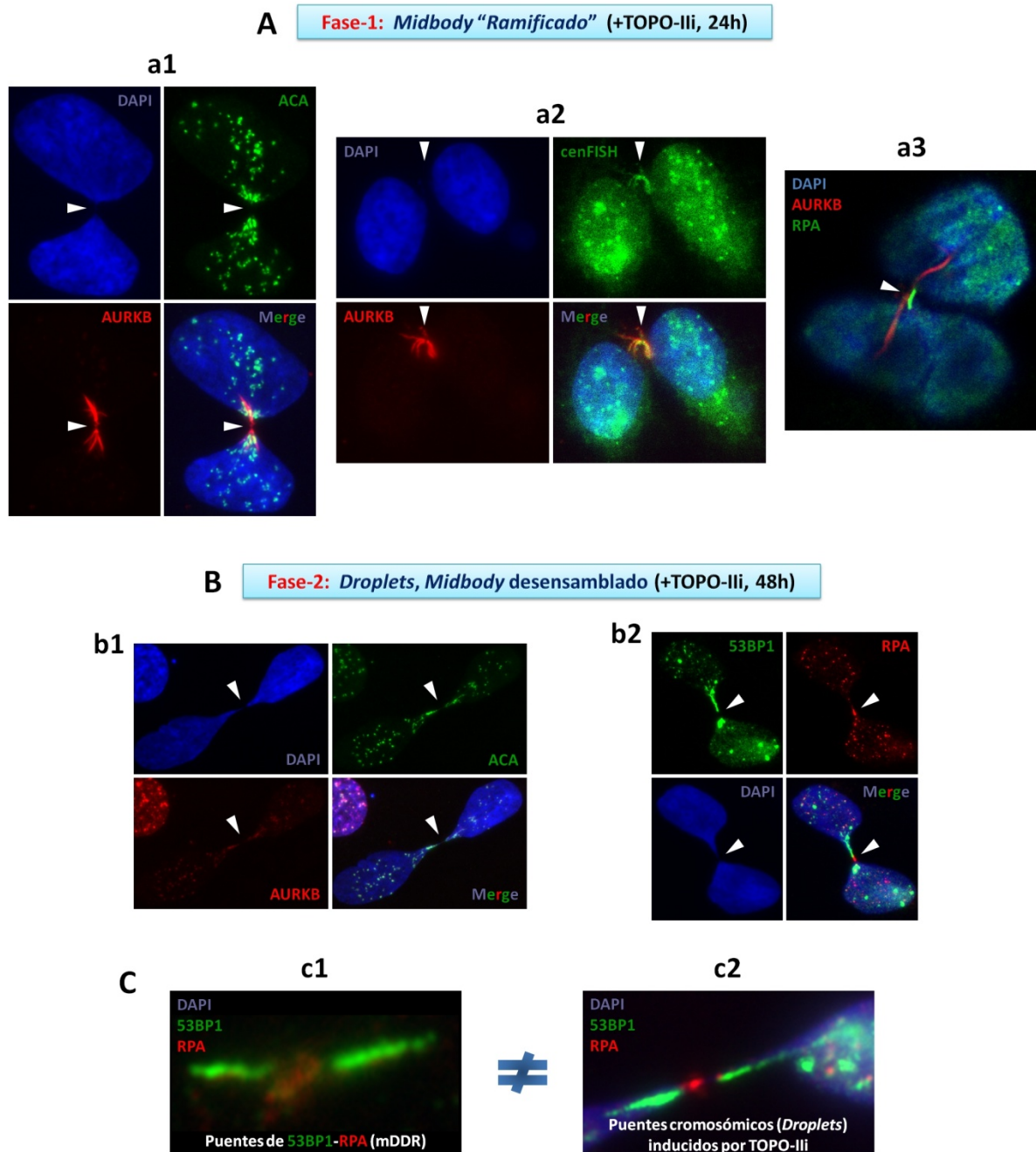


**Figura 55 | Inducción de la formación de 53RBs por la depleción de BLM.** La helicasa BLM fue deplecionada en células U2OS mediante RNAi usando un siRNA contra esta proteína (siBLM). **(A)** Verificación del *knock-down* de BLM mediante *Western blot*. Se analizaron extractos celulares totales de células U2OS no tratadas (U2OS Control), tratadas con el siRNA control (siCTRL Stealth) y tratadas con el siRNA contra BLM (siBLM), obtenidos 72 h post-transfección. El silenciamiento inducido fue prácticamente del 90-100%, ya que la banda de BLM (159 KDa) está ausente en el carril correspondiente al siBLM. La tinción de la membrana con rojo *Ponceau* muestra que las cargas están prácticamente igualadas. **(B)** Cuantificación de 53RBs en las células tratadas con siRNA control ("siCTRL") y con siBLM, en ambos casos sin y con tratamiento con afidicolina (APH) 0.2  $\mu\text{M}$ . Las células se sembraron 48 h tras la transfección de los siRNAs. Después de 24 h, se aplicaron los tratamientos con APH durante otras 24 h. Finalmente, se fijaron y se tiñeron para la detección de 53RBs. Éstos se cuantificaron como porcentajes de 53RBs por par de células, contabilizándose 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. La formación de 53RBs se indujo de forma muy pronunciada con la depleción de BLM, superando a la inducida con el tratamiento con APH. Los efectos de ambos tratamientos no resultaron aditivos, al no apreciarse diferencias significativas entre siBLM no tratado y tratado con APH.

## 2.9. Los 53RBs son diferentes de los puentes cromosómicos inducidos por inhibidores de TOPO-II

En el estudio previo de alteración del *midbody* con tratamientos inductores de inestabilidad genómica, se comprobó que los inhibidores catalíticos de TOPO-II (TOPO-IIi), tanto ICRF-193 como dexrazoxano, daban lugar a *midbodies* aberrantes "ramificados", pero también se observó la aparición de puentes cromosómicos muy evidentes al DAPI. En éstos, los dos núcleos hijos en separación adoptan un aspecto similar a gotas, motivo por el cual estas estructuras son conocidas como *droplets* ("gotitas") de DAPI. Su existencia ha sido puesta de manifiesto en células del ratón *TOPO-II $\alpha$*  KO, letal embrionario que sólo llega a un estadio de 4-8 células debido a este defecto de segregación cromosómica, también apreciable en células tratadas con ICRF-193 (Akimitsu *et al.*, 2003). Estas células atraviesan una fase M inusual denominada fase (ACS)-M, que transcurre con ausencia de

segregación cromosómica (ACS, *absence of chromosome segregation*), tras lo cual sigue una citocinesis forzada sin que llegue a producirse la abscisión (Akimitsu *et al.*, 2003).



Se trató de comprobar si en estos puentes cromosómicos también se ensamblan los 53RBs, lo que supondría un método fácil para la obtención y el estudio de estos últimos. Para ello, se aplicaron tratamientos con TOPO-IIi (ICRF-193 5  $\mu$ M y dexrazoxano 100  $\mu$ M) a células U2OS durante 24 y 48 h, tras lo cual se realizaron tinciones inmunofluorescentes de *midbodies* (AURKB), centrómeros (ACA) y 53RBs (53BP1 y RPA), acompañadas de DAPI para la detección de *droplets*. Se apreciaron importantes diferencias entre los 53RBs y los puentes cromosómicos inducidos por TOPO-IIi. Los efectos del tratamiento con TOPO-IIi se observaron y clasificaron en dos fases diferentes:

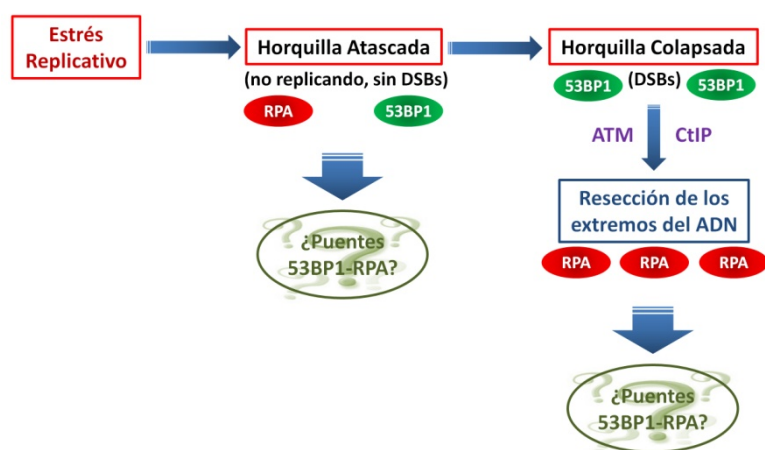
- a) La primera fase transcurre en las primeras 24 h del tratamiento con TOPO-IIi y se caracteriza por la aparición del *midbody* “ramificado” con menor presencia de algunas *droplets* (Figura 56A). Este efecto también aparece con tratamientos más cortos, por lo que probablemente se deba a que, en el cultivo asíncrono, la inhibición de TOPO-II no ha tenido lugar durante el ciclo celular completo, sino sólo en fase G2-M, observándose las células en la siguiente G1. El *midbody* “ramificado” contiene centrómeros en sus ramas, localizadas en los extremos del puente cromosómico en el caso de las *droplets* (Figura 56a1). Las secuencias centroméricas también se detectaron mediante cenFISH (FISH centromérico) en el cuerpo troncal del *midbody* “ramificado” y en sus ramas no localizadas en los extremos del puente cromosómico (Figura 56a2). En la parte de las ramas del *midbody* cercanas a la zona oscura central se observó en ocasiones un tracto de RPA (no el punto característico de los 53RBs), mientras que 53BP1 no se detectó en ningún caso, indicativo de que el 53RB aún no se ha formado (Figura 56a3).
- b) La segunda fase es la correspondiente a las 48 h de tratamiento con TOPO-IIi y se caracteriza por la aparición mayoritaria de *droplets* de DAPI con desensamblaje del *midbody* (Figura 56B). Posiblemente, este efecto se corresponde con una inhibición de TOPO-II a lo largo de un ciclo celular completo, con lo que las células observadas, aun en forma de *droplets*, podrían estar detenidas en fase G2/M. No se apreciaron *midbodies* en ningún *droplet*, aunque sí algunos puntos tenues de Aurora B a lo largo de los puentes cromosómicos y en los núcleos, en el patrón de tinción característico de esta proteína en G2/M antes de profase (Figura 56b1). Se observó una fuerte señal centromérica a lo largo de todos los puentes cromosómicos en los *droplets*, colocalizando con los puntos de Aurora B (Figura 56b1). 53BP1 se localizó formando dos largos tractos a lo largo de los puentes cromosómicos, apareciendo RPA en un tracto corto o punto discreto en medio de ambos, justo en la zona donde la señal del DAPI se hace más débil (Figura 56b2).

Por tanto, los 53RBs y los puentes cromosómicos inducidos por TOPO-IIi, aunque similares morfológicamente, son estructuras diferentes, posiblemente generadas en respuesta a diferentes estímulos o tipos de daño en el ADN (Figura 56C). Estableciendo una comparación entre ambas, la estructura de los 53RBs está constituida por dos ramas de 53BP1 con una zona central de RPA en

forma de punto amplio y difuso; se localizan en *midbodies* persistentes (“*alargados*”) y, por tanto, formarían parte de la mDDR; no contienen centrómeros; si contienen DAPI, la señal es muy tenue; y su formación se induce por estrés replicativo leve o depleción de BLM (Figura 56c1). Por su parte, los puentes cromosómicos inducidos por TOPO-III están constituidos por dos ramas muy intensas de 53BP1 separadas por un tracto más corto o un foco discreto de RPA; aparecen sin formación de *midbody* (normal o “*ramificado*”), por lo que no serían parte de la mDDR como tal; contienen centrómeros; se localizan a lo largo de puentes cromosómicos de *droplets* de DAPI; y su formación se induce por defectos topológicos del ADN y DSBs causados por la inhibición de TOPO-II (Figura 56c2).

## 2.10. Los 53RBs se originan principalmente por rotura de puentes cromosómicos

La mDDR representa una activación de la DDR de forma precisa y localizada en el *midbody* que se forma sobre un puente cromosómico pre-existente. Así pues, tratando de elucidar el origen de los 53RBs a partir del estrés replicativo, se planteó que éstos podrían formarse por dos posibles mecanismos (Figura 57). Una posibilidad es que la mDDR podría representar la señalización de una



**Figura 57 | Posibilidades acerca del origen de los 53RBs.** A partir de estrés replicativo, los 53RBs podrían deberse a horquillas de replicación atascadas sin formación de DSBs, en cuyo caso la señal de RPA sería independiente de resección; o bien a horquillas colapsadas con formación de DSBs y resección (debida a ATM y CtIP), en cuyo caso la señal de RPA sería dependiente de resección.

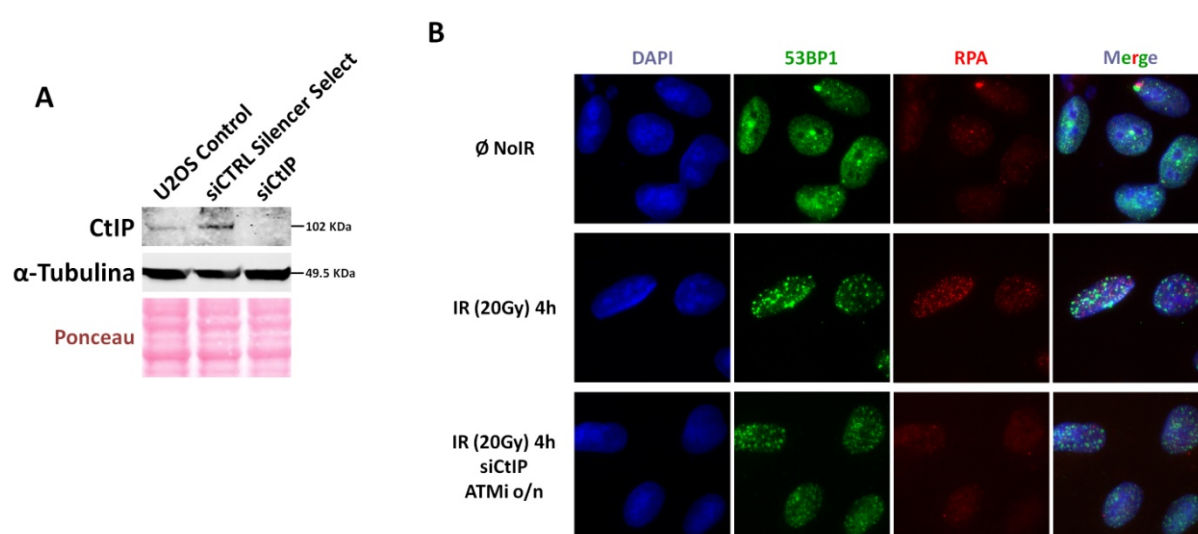
horquilla de replicación atascada, no replicando, y por tanto los 53RBs no serían roturas del ADN. En este caso, la señal de RPA sería independiente de resección (de ATM/CtIP). Otra posibilidad es que la mDDR podría suponer la rotura de un puente cromosómico, ocasionada por el colapso de la horquilla de replicación. Esto generaría DSBs y se produciría la resección de los extremos del ADN. En este caso, la señal de RPA sería dependiente de resección (de ATM/CtIP).

- **Los 53RBs están asociados con resección de los extremos del ADN en DSBs:**

Para determinar cuál de las dos posibilidades expuestas es la que se da predominantemente, se estudió la dependencia de resección de la señal de RPA detectada en los 53RBs en células U2OS. Para ello, se inhibió la resección inhibiendo ATM con KU-55933 (inhibidor de ATM, ATMi) y silenciando CtIP por RNAi con un siRNA (siCtIP). El *knock-down* de CtIP se verificó por *Western-blot* (Figura



58A). Como primer paso experimental, se realizó un control de resección para comprobar la correcta respuesta de RPA ante ésta, así como los efectos de su inhibición (Figura 58B). En un control de células no irradiadas, la inmunofluorescencia de 53BP1 y RPA no muestra focos destacables de estas proteínas. Para observar los efectos de la resección, las células se irradiaron a una dosis de 20 Gy (muy elevada, para inducir muchas DSBs) y se fijaron tras 4 h, observándose por inmunofluorescencia focos de 53BP1, correspondientes a las DSBs, y focos de RPA, originados por resección. Para inhibir la resección, se aplicó la inhibición de ATM (por tratamiento con KU-55933 10  $\mu$ M durante toda la noche) en las células deplecionadas en CtIP, que seguidamente fueron irradiadas con 20 Gy y fijadas 4 h después. Se observaron los focos de 53BP1, pero no los de RPA, cuyo patrón de tinción pan-nuclear fue como en el control no irradiado. Esto indicó que la inhibición de la resección resultó exitosa.



**Figura 58 | Controles de resección para los experimentos de inhibición de ésta.** **(A)** Verificación del *knock-down* de CtIP mediante *Western blot*. Se analizaron extractos celulares totales de células U2OS no tratadas (U2OS Control), tratadas con el siRNA control (siCTRL Silencer Select) y tratadas con el siRNA contra CtIP (siCtIP), obtenidos 72 h post-transfección. El silenciamiento inducido fue prácticamente del 90-100%, ya que la banda de CtIP (102 KDa) está ausente en el carril correspondiente al siCtIP. Se usó la  $\alpha$ -Tubulina (49.5 KDa) como control de carga y de especificidad del silenciamiento. Se muestra también la tinción de la membrana con rojo *Ponceau*. **(B)** Controles de resección. Tinciones inmunofluorescentes de 53BP1 (verde), RPA (rojo) y núcleos (DAPI, azul) en células U2OS. La resección se indujo por irradiación a 20 Gy con 4 h de reposo. Se puso de manifiesto en la formación de focos de RPA característicos, ausentes tanto en el control no irradiado ( $\emptyset$  NoIR) como en el tratamiento de inhibición de resección. Éste consistió en el silenciamiento de CtIP con siCtIP junto con tratamiento con KU-55933, inhibidor de ATM (ATMi), a 10  $\mu$ M durante toda la noche (o/n). Los focos de 53BP1 presentes únicamente en los tratamientos con irradiación muestran la presencia de DSBs.

Para comprobar los efectos de la resección sobre los 53RBs a nivel cualitativo, se realizaron tinciones inmunofluorescentes de éstos en células no tratadas, con inhibición de ATM y con siCtIP, siendo los dos últimos los tratamientos de inhibición de la resección (Figura 59A). Los 53RBs fueron normales en el control, mostrando la zona central con menor señal de 53BP1 y el acúmulo característico de RPA con una señal mayor que la nuclear. En cambio, al inhibir la resección, se

observó en los 53RBs una disminución de la señal de RPA en su zona central con respecto a la señal nuclear, junto a un incremento en la señal de 53BP1 en esa misma zona.

A fin de poder cuantificar este efecto de la resección sobre la señal de RPA en los 53RBs, se llevó a cabo un experimento análogo pero detectando los 53RBs por inmunofluorescencia de RPA y Aurora B, proteína que colocaliza con 53BP1 en los 53RBs pero no participa en la DDR a las DSBs, por lo que está exenta de los posibles efectos de la inhibición de la resección y por tanto puede ser usada para relativizar la señal de RPA en la zona central de los 53RBs. Se usaron células U2OS no silenciadas (tratadas con el siRNA control, siCTRL) no tratadas y con tratamiento con ATMi durante toda la noche (inhibición de resección), y las mismas células con CtIP silenciado (tratadas con siCtIP) no tratadas (inhibición de resección) y con tratamiento con ATMi durante toda la noche (inhibición más potente de resección). Los resultados fueron análogos a los obtenidos en el experimento anterior (Figura 59B). El control no silenciado y no tratado, con resección intacta, presentó la característica señal intensa de RPA en la zona central de los 53RBs en comparación con la del núcleo, con Aurora B (*midbody* persistente) en las ramas de éstos. En los tratamientos de inhibición de resección, la señal de RPA en la zona central de los 53RBs apareció disminuida respecto a la nuclear, mientras que la de Aurora B se mantuvo inalterada. Este efecto resultó mayor en el tratamiento de inhibición más potente de resección (siCtIP con ATMi), donde las células mostraron una señal de RPA en la zona central de los 53RBs incluso menos intensa que en los otros dos tratamientos de inhibición de resección. Estos resultados se cuantificaron con software de análisis de imagen determinando la señal de RPA en los 53RBs (en unidades de fluorescencia, u.f.) como la relación entre la señal de RPA en la zona central del 53RB (“RPA Central”) con respecto a la señal de RPA nuclear (“RPA Nuclear”), dividida entre la relación entre la señal de Aurora B en el *midbody* (“AURKB *Midbody*”) con respecto a la señal de Aurora B nuclear (“AURKB Nuclear”) (Figura 59C). Este parámetro se calculó en 10 53RBs para cada uno de los 4 tratamientos, y los resultados se representaron en la gráfica de la Figura 59D. Se obtuvieron diferencias significativas bastante evidentes entre el control y los tratamientos de inhibición de resección. El efecto de los tratamientos simples resultó ser equivalente, disminuyendo la señal de RPA en la zona central de los 53RBs en un  $\approx 60\%$ . Este efecto resultó mayor en el tratamiento doble, que la redujo en un  $\approx 80\%$ .

Así pues, nuestro modelo propone que la mDDR representa la resolución de puentes cromosómicos que han persistido incluso más allá de anafase entre dos células hijas en G1 aparentemente independientes que permanecen conectadas por puentes de ADN. Los 53RBs se originarían como consecuencia de la mDDR a tiempos tardíos, constituyendo un marcador de su activación.



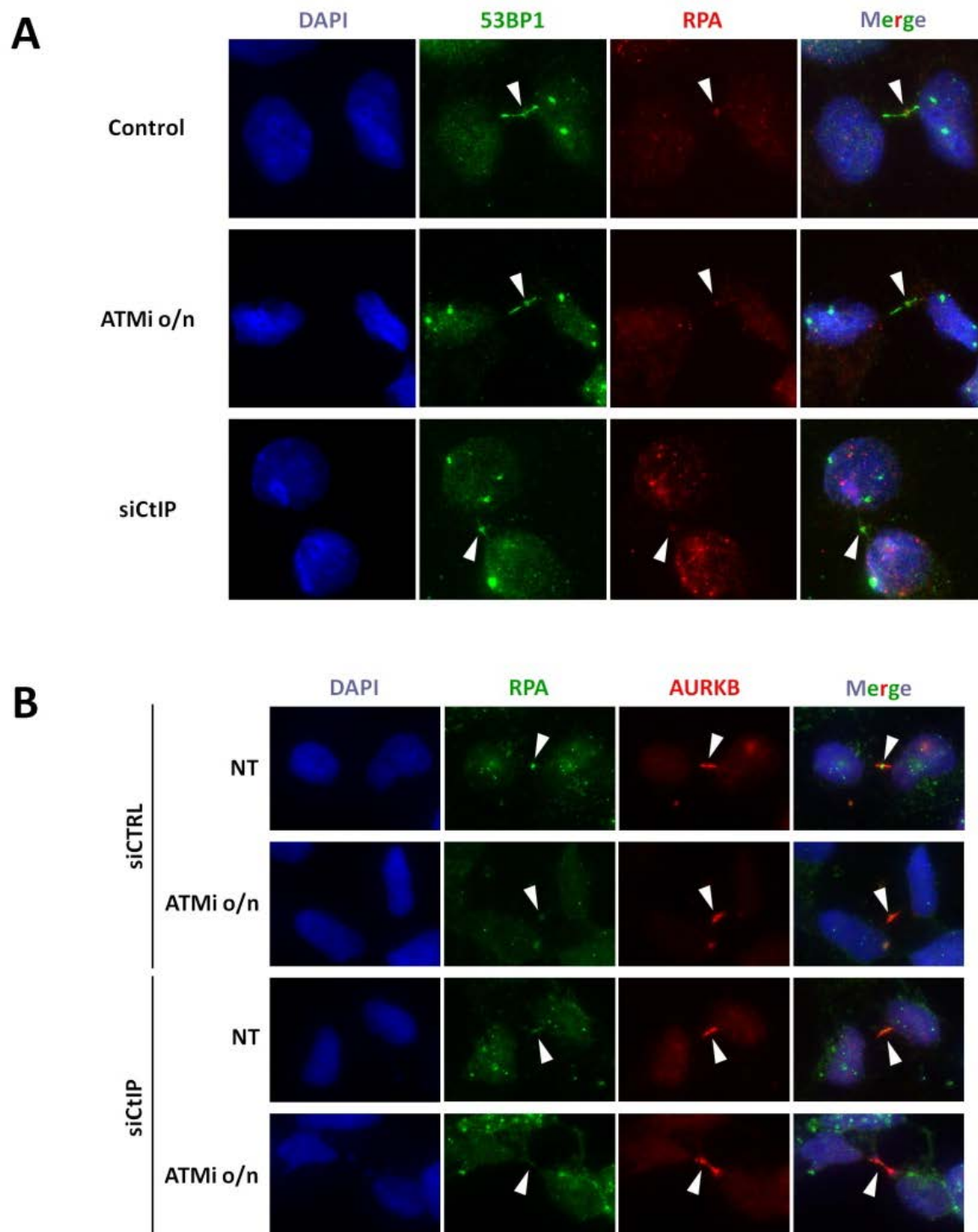
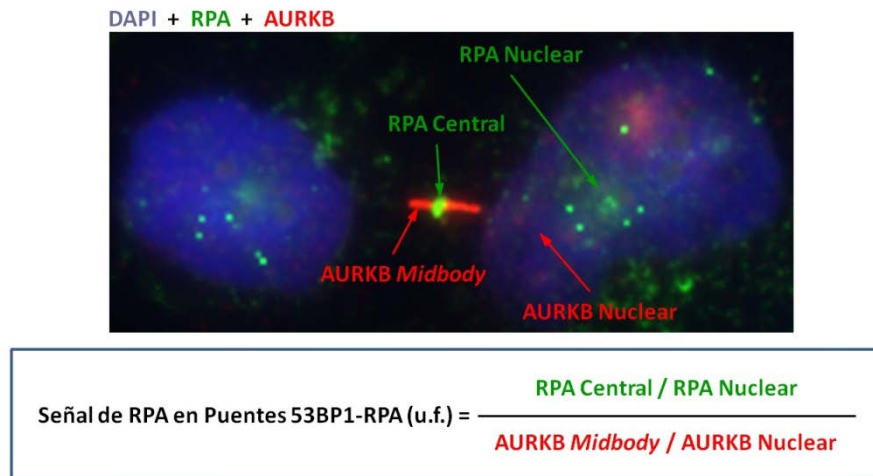
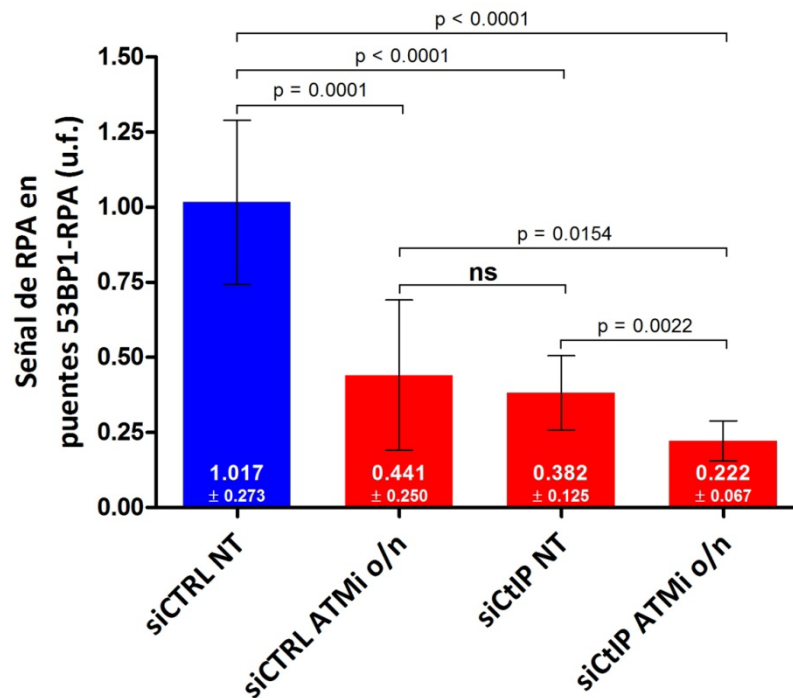


Figura 59 (Sigue en la página siguiente) | Asociación de los 53RBs con DSBs reseccionadas.

C



D

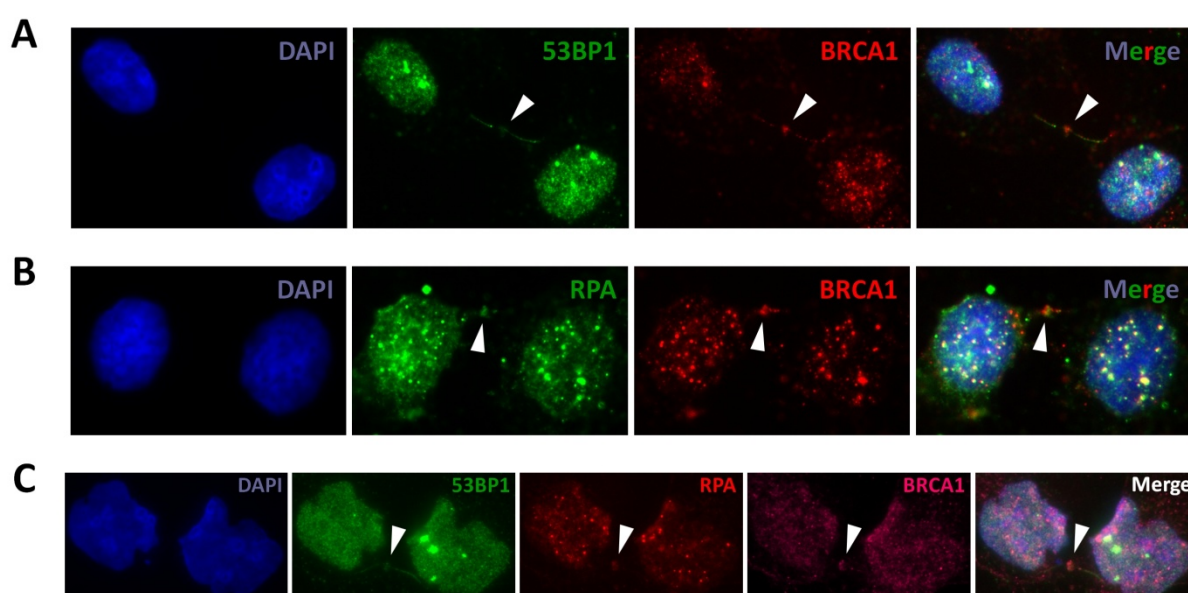


**Figura 59 (Continuación) | Asociación de los 53RBs con DSBs reseccionadas.** (A) Tinción inmunofluorescente de 53RBs en células U2OS. 53BP1, verde; RPA, rojo; núcleos, azul (DAPI). Al inhibir la resección por tratamiento con inhibidor de ATM (ATMi, KU-55933 10  $\mu$ M durante toda la noche, o/n) o por silenciamiento de CtIP por RNAi con un siRNA (siCtIP), la señal de RPA en la zona central de los 53RBs (señalada con flechas) disminuyó su intensidad, mientras que la de 53BP1 en esta misma zona aumentó, respecto al control no tratado. (B) Tinción inmunofluorescente de 53RBs en células U2OS. Experimento para cuantificación. RPA, verde; AURKB, rojo; núcleos, azul (DAPI). Al inhibir la resección con ATMi, con siCtIP o con ambos tratamientos, la señal de RPA en la zona central de los 53RBs (señalados con flechas) disminuye respecto a la del control sin inhibición de resección, mientras que la señal de AURKB se mantiene inalterada en todos los casos. El efecto es más pronunciado con siCtIP y ATMi conjuntamente. siCTRL, siRNA control (siCTRL Silencer Select); siCtIP, siRNA contra CtIP; NT, no tratado; ATMi, inhibidor de ATM (KU-55933 10  $\mu$ M durante toda la noche, o/n). (C) Método de cuantificación de la señal de RPA en los 53RBs, a partir del experimento anterior. Las intensidades de fluorescencia en unidades de fluorescencia (u.f.) se obtuvieron por análisis de imagen de los canales separados con el programa *ImageJ*, en 10 53RBs para cada caso. (D) Cuantificación final del experimento, mostrando las diferencias anteriormente descritas.

- **Los 53RBs contienen BRCA1, predominantemente en la zona central de RPA:**

El anterior resultado se ve apoyado por la detección por inmunofluorescencia de BRCA1 mayoritariamente en la zona central de los 53RBs, cuya presencia es indicativa de resección de los extremos del ADN. La tinción inmunofluorescente de 53RBs para 53BP1 y BRCA1 reveló que esta última se localiza en la zona central, entre las dos ramas de 53BP1 (Figura 60A). La tinción de RPA y BRCA1 mostró la colocalización de éstas en la zona central de los 53RBs (Figura 60B). La triple inmunofluorescencia de 53BP1, RPA y BRCA1 confirmó estas localizaciones (Figura 60C).

Por tanto, como ya se ha demostrado, la región central de los 53RBs, situada en la zona oscura del *midbody* persistente, contiene RPA, BRCA1 y ssDNA. Además, en los estudios iniciales de la mDDR, se detectó en esa misma región la presencia de RAD51. Todos estos elementos son característicos de la presencia de resección de los extremos del ADN y de reparación por HR.

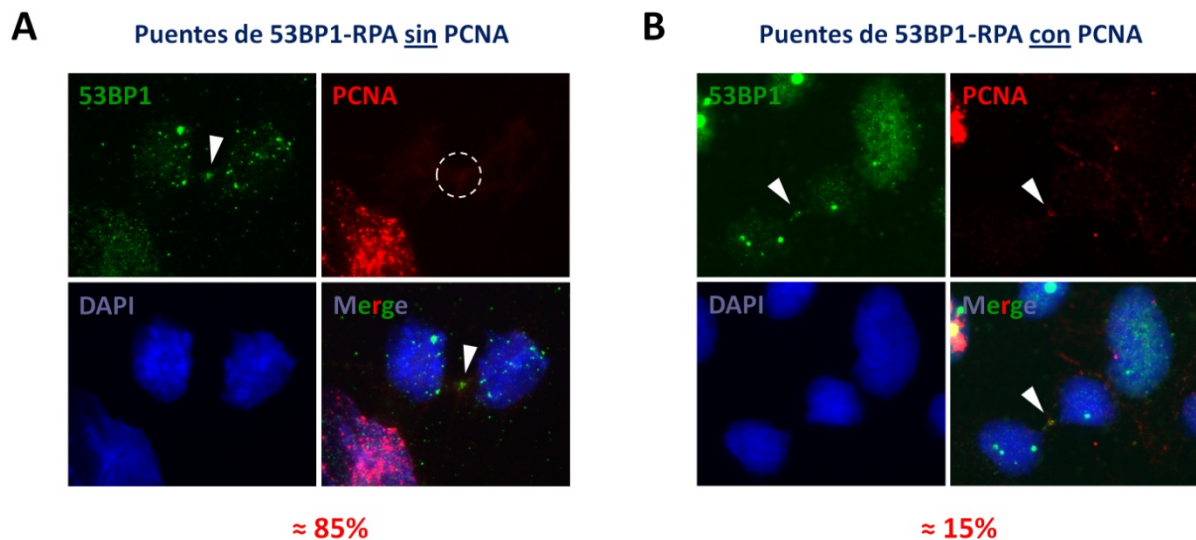


**Figura 60 | Presencia de BRCA1 en la zona central de los 53RBs.** Inmunofluorescencias en células U2OS aplicando el protocolo de detección de 53RBs, con los núcleos teñidos con DAPI (azul). **(A)** Tinción inmunofluorescente de 53BP1 (verde) y BRCA1 (rojo), mostrando la localización de esta última en la zona central de los 53RBs. **(B)** Tinción inmunofluorescente de RPA (verde) y BRCA1 (rojo), mostrando su colocalización en la zona central de los 53RBs. **(C)** Tinción inmunofluorescente de 53BP1 (verde), RPA (rojo) y BRCA1 (magenta), confirmando las localizaciones anteriores. Las flechas señalan la zona central de los 53RBs.

- **Algunos 53RBs podrían contener ADN no replicado:**

A pesar de los resultados anteriores, no puede descartarse que la otra posibilidad no se dé en cierta medida, y que por tanto existan algunos 53RBs que contengan ADN no replicado. Para comprobarlo, se efectuó una tinción inmunofluorescente de 53RBs para 53BP1 y PCNA (antígeno nuclear de células proliferantes, *proliferating-cell nuclear antigen*), proteína del complejo de replicación que marca zonas donde ésta se está produciendo o bien donde está detenida (horquillas atascadas). Se

observó que en la mayoría de los 53RBs ( $\approx 85\%$ ) no está presente PCNA (Figura 61A), mientras que existe una minoría de ellos ( $\approx 15\%$ ) en los que aparece una ligera señal de ésta justo en la zona central del 53RB (Figura 61B). Estos últimos casos podrían deberse a la presencia de ADN no replicado en esa minoría de 53RBs. No obstante, hay que considerar que PCNA también es reclutado a las lesiones donde actúan las polimerasas de síntesis translesión (TLS), por lo que no es necesariamente indicativo de que en esa zona exista ADN no replicado.



**Figura 61 | Presencia de PCNA en la zona central de una minoría de 53RBs.** Inmunofluorescencia en células U2OS aplicando el protocolo de detección de 53RBs. 53BP1, verde; PCNA, rojo; núcleos, azul (DAPI). **(A)** 53RBs (con flechas) que no contienen PCNA ( $\approx 85\%$ ). Sólo los núcleos en fase S son positivos para PCNA, apreciándose éste en los focos de replicación. **(B)** 53RBs (con flechas) que contienen PCNA ( $\approx 15\%$ ). En una minoría de 53RBs se observó señal de PCNA en la zona central de RPA, aun a pesar de que los núcleos interconectados (en fase G1) resultaron negativos para PCNA.

### 3. Relación de la mDDR con la condensación cromosómica

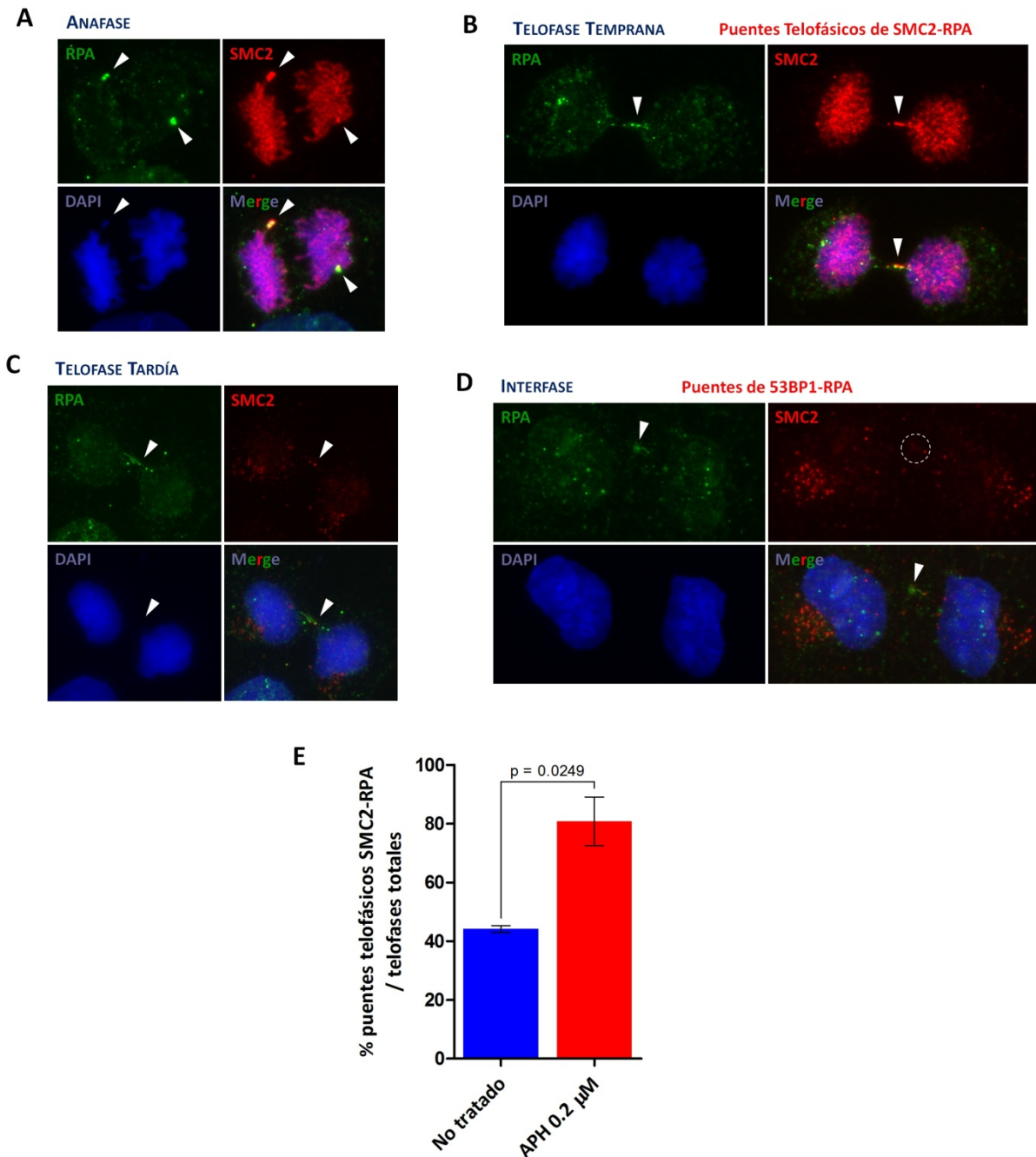
Como ya se ha mencionado, los 53RBs se relacionan con los 53BP1 NBs, al menos en la medida en que siempre que aparecen los primeros se dan los segundos, además de verse incrementada la formación de ambos en condiciones de estrés replicativo leve y con depleción de BLM. Otra característica de los 53BP1 NBs demostrada experimentalmente es que su formación depende de la hipercondensación mitótica de la cromatina, que genera roturas de ADN mitóticas en los sitios frágiles sujetos a estrés replicativo sobre los que se forman los 53BP1 NBs en la siguiente fase G1 (Lukas C. *et al.*, 2011). Así pues, la depleción de las condensinas, en concreto de SMC2 (mantenimiento estructural de los cromosomas 2, *structural maintenance of chromosomes 2*), ocasiona una reducción en la formación de 53BP1 NBs (Lukas C. *et al.*, 2011), con lo que la condensación cromosómica apropiada parece ser un requisito para la aparición de éstos. Dada la relación observada entre los 53RBs y los 53BP1 NBs, nos planteamos la cuestión de si los 53RBs y, por extensión, la mDDR también dependen de la condensación cromosómica.

### 3.1. El reclutamiento de RPA al ADN hipercondensado podría ser el origen de los 53RBs

Nuestros estudios sobre la relación de la mDDR con la condensación cromosómica comenzaron con tinciones inmunofluorescentes de la condensina SMC2 y RPA en células U2OS, aplicando el protocolo de detección de 53RBs, con el objetivo de tratar de identificar alguna relación entre SMC2 y los 53RBs, detectables por sus zonas centrales de RPA. De modo interesante, se observó que existe un reclutamiento de RPA hacia zonas concretas de ADN hipercondensado, considerando este último como el que está constituyendo los cromosomas mitóticos e interaccionando con SMC2. Este fenómeno se observó desde que tiene lugar la mitosis, con diferencias en distintos estadios:

- a) En anafase (Figura 62A), se observó que todos los cromosomas mitóticos en separación se hallan en estado hipercondensado, esto es, cubiertos por SMC2. El núcleo está desmantelado y la tinción de RPA fue prácticamente inexistente, salvo por ciertos focos muy intensos que colocalizaron con focos de SMC2 en zonas de los cromosomas donde esta última apareció especialmente concentrada, y las cuales frecuentemente coincidieron con cromosomas retardados (*lagging chromosomes*), puentes anafásicos u otros defectos de segregación. Estos focos podrían corresponderse con regiones de ADN especialmente hipercondensadas, posiblemente sitios frágiles, que arrastran las consecuencias del estrés replicativo (presencia de ssDNA) y por tanto son susceptibles de sufrir roturas, quedando así marcadas por RPA.
- b) En telofase temprana (Figura 62B), con todos los cromosomas recién separados y aún hipercondensados y cubiertos por SMC2, se observaron en algunos casos unas estructuras características en forma de puentes conectando los dos conjuntos cromosómicos separados, en las que un tracto de RPA colocaliza con otro de SMC2, que aparece en él especialmente concentrado. Estas estructuras se denominaron puentes telofásicos de SMC2-RPA, y podrían ser la evolución de los focos de RPA y SMC2 observados en anafase, así como un estadio previo a los posteriores 53RBs. Los puentes telofásicos de SMC2-RPA resultaron ser negativos al DAPI, por lo que, unido a la presencia de RPA, podría indicar que contienen ssDNA, lo que refuerza la hipótesis de que podrían proceder de regiones genómicas especialmente sensibles a estrés replicativo, como son los sitios frágiles.
- c) En telofase tardía (Figura 62C), se siguieron observando los puentes telofásicos de SMC2-RPA conectando algunos núcleos pre-formados en separación. El tracto de RPA siguió destacando sobre la señal nuclear, aún muy reducida. La tinción de SMC2 prácticamente desapareció por completo debido a la descondensación de los cromosomas (se observó cierta señal residual citosólica, característica del tratamiento de pre-extracción), a excepción de un reducido tracto o algunos focos colocalizando con RPA en el puente telofásico de SMC2-RPA, en el cual a veces se observaron algunos segmentos de DAPI.





**Figura 62 | Reclutamiento de RPA al ADN hipercondensado.** Inmunofluorescencia en células U2OS aplicando el protocolo de detección de 53RBs. RPA, verde; SMC2, rojo; ADN, azul (DAPI). El ADN hipercondensado es el que está constituyendo los cromosomas mitóticos y, por tanto, recubierto por SMC2. **(A)** En anafase, se observaron algunos focos de RPA colocalizando con SMC2 (indicados por flechas), que se correspondieron con cromosomas retardados (*lagging chromosomes*) y puentes anafásicos. **(B)** En telofase temprana, se observó la formación de puentes telofásicos de SMC2-RPA (señalados con flechas) conectando algunos núcleos en pre-formación. **(C)** En telofase tardía, aún persistieron los puentes telofásicos de SMC2-RPA (señalados con flechas), incluso cuando SMC2 ya no está unida al ADN. **(D)** En interfase, desaparecieron por completo los puentes telofásicos de SMC2-RPA, dando lugar a los puentes de 53BP1-RPA (indicados por flechas). **(E)** Cuantificación de la formación de puentes telofásicos de SMC2-RPA, en un control no tratado y en condiciones de estrés replicativo leve (tratamiento con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante 24 h). Se calcularon los porcentajes de puentes telofásicos de SMC2-RPA respecto del total de telofases analizadas, contabilizándose 250 en cada una de 3 réplicas independientes. El estrés replicativo leve indujo considerablemente la formación de estas estructuras.

- d) En interfase (Figura 62D), desaparecieron por completo todos los puentes de SMC2-RPA, pero en cambio aparecieron los de 53BP1-RPA, con RPA ocupando su región central adoptando la forma del punto difuso característico, pero con total ausencia de SMC2. Al no existir condensación cromosómica, la señal nuclear de SMC2 resultó prácticamente inexistente (se apreció la señal citosólica residual característica del tratamiento de pre-extracción). En este estadio, los puentes telofásicos de SMC2-RPA, que en las fases anteriores tendrían excluida a 53BP1 debido a la inactivación mitótica de la DDR secundaria, habrían evolucionado hacia 53RBs debido al reclutamiento de 53BP1. Según nuestros resultados anteriores, éste podría producirse debido al colapso de las horquillas de replicación, posiblemente ocasionado por la hipercondensación mitótica del ADN, anteriormente atascadas con ssDNA y RPA unida, pero ahora generando DSBs que además sufren resección, lo que hace que RPA y 53BP1 adopten esa disposición característica en los 53RBs.

Se cuantificaron los puentes telofásicos de SMC2-RPA, obteniéndose que aparecen con una frecuencia de  $\approx 42.5\%$  del total de telofases (Figura 62E). Para verificar nuestra hipótesis de que podrían generarse como consecuencia del estrés replicativo, se cuantificaron también en condiciones de estrés replicativo leve, con tratamiento con APH  $0.2 \mu\text{M}$  durante 24 h. Su frecuencia se incrementó considerablemente, pasando a ser de  $\approx 80\%$  del total de telofases (Figura 62E). Esto indicó que la formación de puentes telofásicos de SMC2-RPA se induce en condiciones de estrés replicativo leve, al igual que ocurre con los 53BP1 NBs y los 53RBs, reforzando ello el vínculo que estas nuevas estructuras poseen con las anteriores.

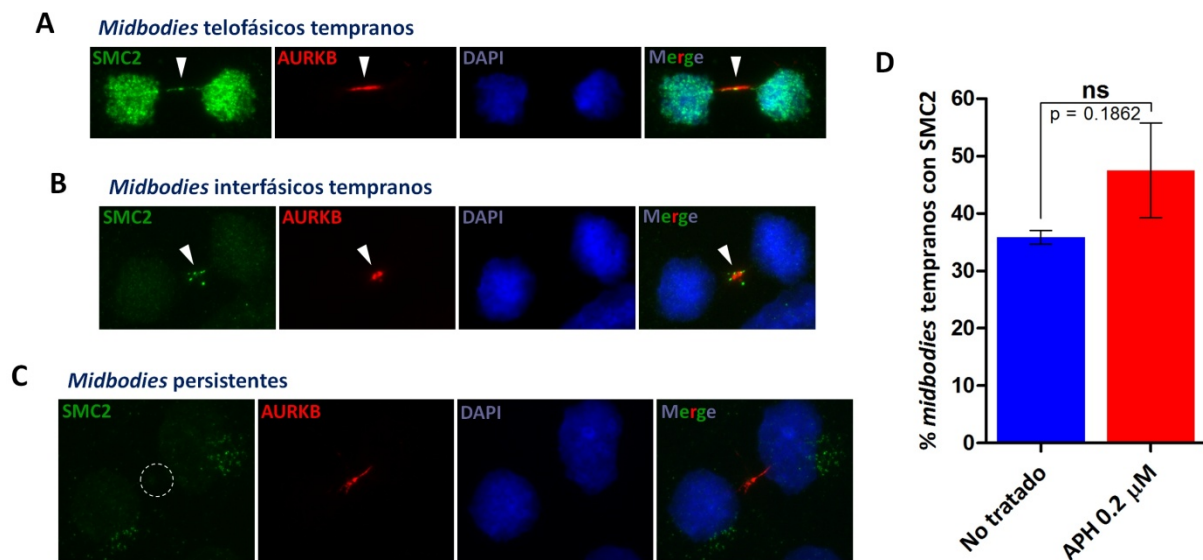
### 3.2. Los *midbodies* podrían formarse en torno a remanentes de cromatina hipercondensada

Una vez descubierta la relación entre la hipercondensación de la cromatina y la formación de los 53RBs, el siguiente paso en nuestra investigación consistió en elucidar si existe alguna relación entre la primera y la formación del *midbody*, ya que éste es el encargado de evocar la mDDR, siendo los 53RBs una consecuencia de ella. Con este propósito, en esta ocasión se realizaron tinciones inmunofluorescentes de la condensina SMC2 y Aurora B como marcador de *midbodies*, en células U2OS, aplicando el protocolo de detección de 53RBs. Se encontró que SMC2 está presente en los *midbodies* tempranos, adoptando la forma de un tracto o de varios focos, en ambos casos de señal muy intensa, lo que indica que son regiones especialmente hipercondensadas. Esta disposición de SMC2 es análoga a la que adopta en los puentes telofásicos de SMC2-RPA, por lo que puede concluirse que los *midbodies* tempranos colocan a los 53RBs. La presencia de SMC2 en el *midbody* se observó en *midbodies* telofásicos tempranos, con SMC2 aún presente en los cromosomas (Figura 63A), así como en *midbodies* interfásicos tempranos, sin SMC2 en los cromosomas (Figura 63B). No obstante, no se



detectó señal de DAPI en ninguno de estos *midbodies*. En ningún caso se observó SMC2 en *midbodies* persistentes (Figura 63C), al igual que tampoco aparecía en los 53RBs, que colocalizan con aquéllos.

La presencia de SMC2 en *midbodies* tempranos se cuantificó determinando el porcentaje de *midbodies* tempranos que contienen SMC2 respecto del total de éstos, obteniéndose una frecuencia de  $\approx 36\%$  (Figura 63D). Para analizar si la presencia de SMC2 en *midbodies* tempranos es un efecto dependiente de estrés replicativo, se realizó esta misma cuantificación en células sometidas a estrés replicativo leve por tratamiento con APH 0.2  $\mu\text{M}$  durante 24 h (Figura 63D). Aunque se obtuvo cierto incremento en la frecuencia de *midbodies* tempranos con SMC2 ( $\approx 47\%$ ), las diferencias no llegaron a resultar significativas, por lo que la presencia de SMC2 en los *midbodies* tempranos es independiente del estrés replicativo.



**Figura 63 | Presencia de SMC2 en *midbodies* tempranos.** Inmunofluorescencia en células U2OS aplicando el protocolo de detección de 53RBs. SMC2, verde; AURKB, rojo; ADN, azul (DAPI). **(A)** SMC2, indicativa de la presencia de cromatina hipercondensada, se localizó en algunos *midbodies* telofásicos tempranos. Los cromosomas aún se mantienen hipercondensados, con SMC2 unida a ellos. **(B)** SMC2 también apareció en algunos *midbodies* interfásicos tempranos, en una región más difusa con focos de SMC2 que supondrían remanentes de cromatina hipercondensada sobre los cuales se forma el *midbody*. Los cromosomas ya no están hipercondensados, puesto que no contienen SMC2. **(C)** Ausencia de SMC2 en los *midbodies* persistentes. **(D)** Cuantificación de la presencia de SMC2 en los *midbodies* tempranos. Se calculó el porcentaje de *midbodies* tempranos con SMC2 respecto del total de *midbodies* tempranos, contabilizándose 300 en cada una de 3 réplicas independientes. Este fenómeno es independiente de estrés replicativo, ya que no se apreciaron diferencias significativas entre el control no tratado y el tratamiento con afidicolina (APH) 0.2  $\mu\text{M}$  durante 24 h.

La colocalización de SMC2 con Aurora B en los *midbodies* tempranos no resultó perfecta, sino más bien difusa (Figura 63A y B). No obstante, llamó especialmente la atención que esa señal de SMC2 fuera la única presente entre los núcleos en pre-formación y, en el caso de los *midbodies* interfásicos tempranos, la única existente en todo el núcleo, adoptando la forma de un grupo de focos en cuya región aparece Aurora B. Por otra parte, teniendo en cuenta que los focos de SMC2 colocalizando con

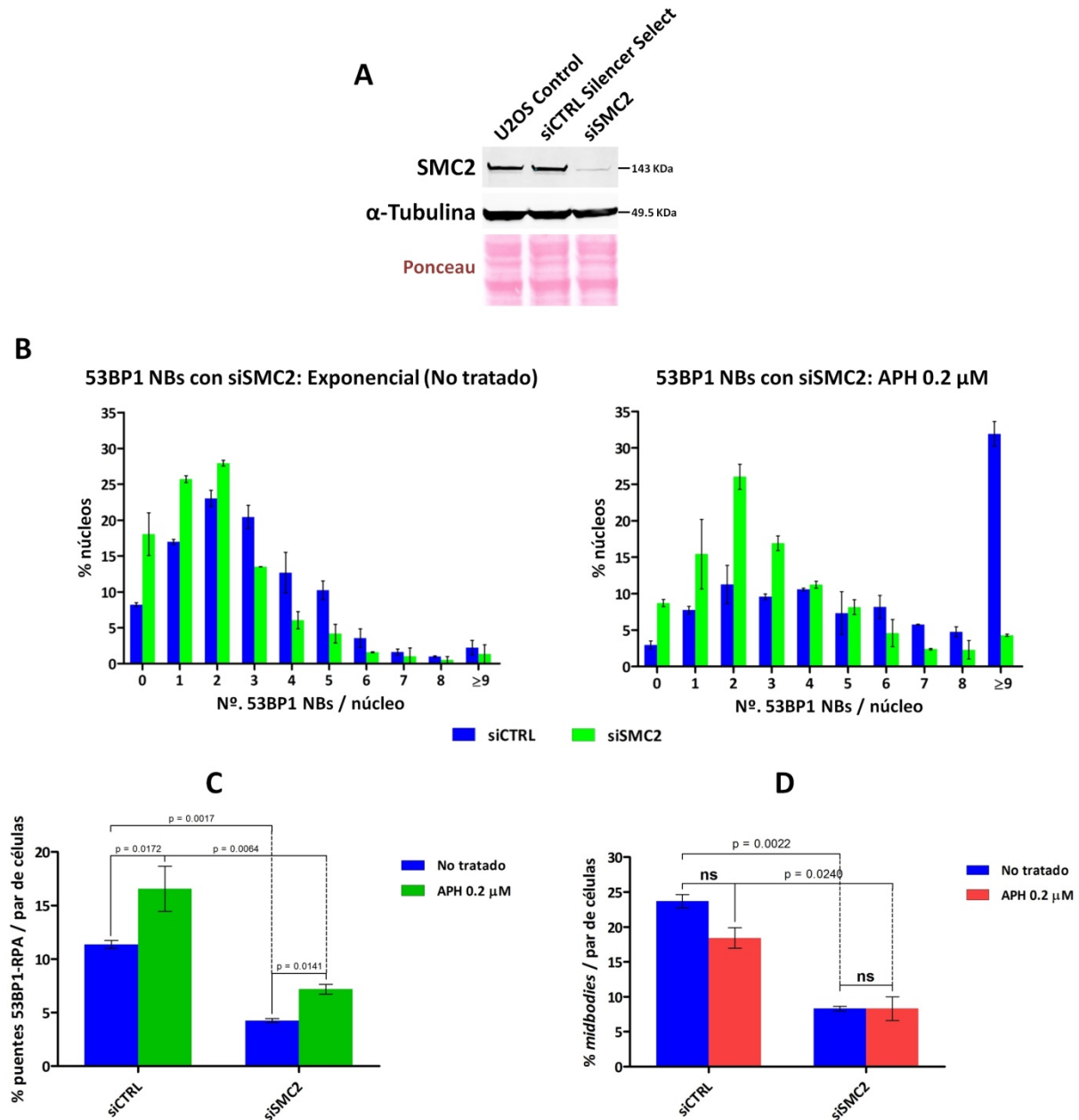
los de RPA están presentes desde anafase, antes de la formación del *midbody*, puede inferirse que el *midbody* se forma en torno a esta región de SMC2, que constituiría un remanente de cromatina hipercondensada. Esto refuerza la idea de que Aurora B podría dirigir la formación del *midbody* sobre restos de cromatina hipercondensada, que actuarían como “guías” para su ensamblaje. De este modo, se activaría además la mDDR, encargada de la reparación de este puente cromosómico. Por otra parte, el hecho de que no se encontraran diferencias significativas en la frecuencia de *midbodies* tempranos con SMC2 entre células no tratadas y sometidas a estrés replicativo leve, podría indicar que la formación del *midbody* en torno a remanentes de cromatina hipercondensada es un fenómeno innato, independiente de la presencia de daño en el ADN. Así, Aurora B tendría la capacidad intrínseca de disparar la mDDR en el *midbody*, en caso de que en esa región existieran puentes cromosómicos.

### 3.3. La mDDR requiere una correcta condensación cromosómica

Con el objetivo de concretar en qué medida la mDDR depende de la condensación cromosómica, se estudiaron los efectos de la pérdida de ésta en los fenómenos relacionados con la mDDR. Para ello, se indujeron defectos de condensación cromosómica en células U2OS mediante la depleción de la condensina SMC2 por RNAi usando un siRNA (siSMC2). El *knock-down* de SMC2 se verificó por *Western blot* (Figura 64A).

- **Los defectos de condensación cromosómica empeoran la formación de 53BP1 NBs:**

En primer lugar, se analizó la formación de 53BP1 NBs, dada su relación con los 53RBs. A partir de tinciones inmunofluorescentes de 53BP1, se cuantificó el porcentaje de núcleos que presentaban un número concreto de 53BP1 NBs (de 0 a 8 y  $\geq 9$ ) en las células control de silenciamiento (siCTRL) comparadas con las células con SMC2 silenciado (siSMC2), portadoras de defectos de condensación cromosómica (Figura 64B). En células no tratadas, en crecimiento exponencial, se apreció cierto defecto en la formación de 53BP1 NBs con la depleción de SMC2 en comparación con el control de silenciamiento, ya que en el primer caso se apreció una mayor cantidad de núcleos con pocos 53BP1 NBs (0, 1 ó 2), y menor cantidad de núcleos con más 53BP1 NBs (3, 4, 5 ó 6). Los porcentajes de núcleos con muchos 53BP1 NBs (7, 8 ó  $\geq 9$ ) fueron reducidos y similares en ambos casos. Sin embargo, el defecto en la formación de 53BP1 NBs causado por la depleción de SMC2 se hizo mucho más evidente en células sometidas a estrés replicativo leve por tratamiento con APH 0.2  $\mu$ M durante 24 h. En estas condiciones, la mayoría de los núcleos del control de silenciamiento presentaron muchos 53BP1 NBs ( $\geq 9$ ), mientras que las células deplecionadas en SMC2 no experimentaron tal transición, con la mayoría de sus núcleos presentando pocos 53BP1 NBs (1, 2 ó 3) y sin un aumento considerable en la cantidad de núcleos con muchos 53BP1 NBs (7, 8 ó  $\geq 9$ ). De estos datos se concluyó que la formación de 53BP1 NBs requiere de la correcta condensación cromosómica. Estos resultados son análogos a los descritos por Lukas C. *et al.*, 2011.



**Figura 64 | Los defectos de condensación cromosómica empeoran la mDDR.** Se indujeron defectos de condensación cromosómica en células U2OS mediante depleción de la condensina SMC2 por RNAi con un siRNA (siSMC2). Las células se sembraron 48 h post-transfección y 24 h después se aplicaron tratamientos con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante otras 24 h para inducir estrés replicativo leve. Seguidamente, se fijaron y se tiñeron para inmunofluorescencia. Las cuantificaciones se realizaron contabilizando 350-500 núcleos en 3 réplicas independientes. siCTRL, siRNA control (siCTRL Silencer Select); siSMC2, siRNA contra SMC2. **(A)** Verificación del *knock-down* de SMC2 mediante *Western blot*. Se analizaron extractos celulares totales de células U2OS no tratadas (U2OS Control), tratadas con el siRNA control (siCTRL Silencer Select) y tratadas con el siRNA contra SMC2 (siSMC2), obtenidos 72 h post-transfección. El silenciamiento inducido fue de  $\approx$ 90%, ya que la banda de SMC2 (143 KDa) se redujo considerablemente en el carril correspondiente al siSMC2. Se usó la  $\alpha$ -Tubulina (49.5 KDa) como control de carga y de especificidad del silenciamiento. Se muestra también la tinción de la membrana con rojo *Ponceau*. **(B)** Cuantificación de 53BP1 NBs en inmunofluorescencias de 53BP1. Porcentaje de núcleos conteniendo un número determinado de 53BP1 NBs, en categorías. La depleción de SMC2 redujo la formación de 53BP1 NBs, con efecto más apreciable en el tratamiento con APH (gráfica de la derecha) respecto al control no tratado, en crecimiento exponencial (gráfica de la izquierda). **(C)** Cuantificación de 53RBs en inmunofluorescencias de 53BP1 y RPA. Frecuencias en porcentajes de 53RBs por par de células. El silenciamiento de SMC2 redujo la formación de 53RBs, independientemente del efecto inductor de la APH. **(D)** Cuantificación de *midbodies* en inmunofluorescencias de AURKB y  $\alpha$ -Tubulina. Frecuencias en porcentajes de *midbodies* por par de células. La *downregulación* de SMC2 redujo la formación de *midbodies*, sin efecto apreciable de la APH.

- **Los defectos de condensación cromosómica empeoran la formación de 53RBs:**

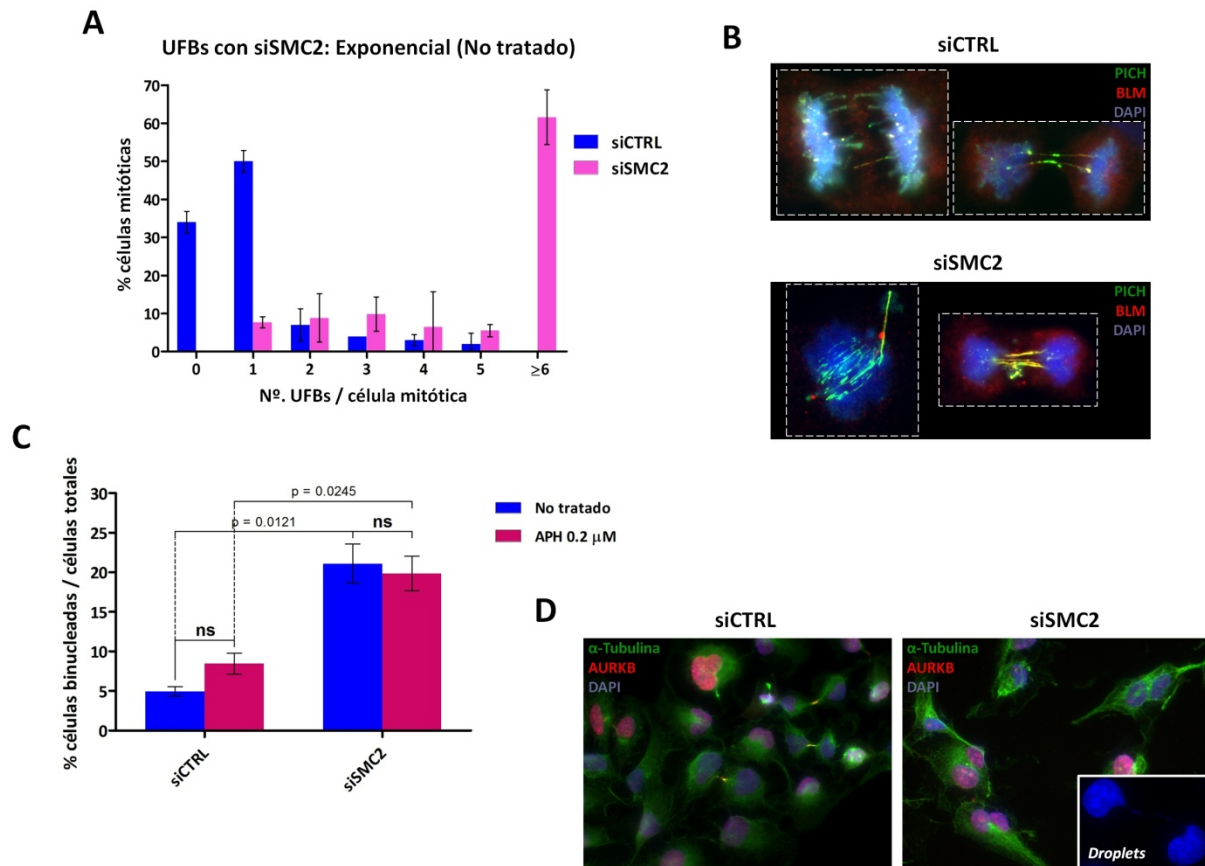
Habiéndose comprobado esta dependencia entre la formación de 53BP1 NBs y la condensación cromosómica, el siguiente paso consistió en analizar si ocurre lo mismo con los 53RBs, dada su relación con los 53BP1 NBs y su carácter de marcador de la activación de la mDDR. A partir de tinciones inmunofluorescentes de 53RBs para 53BP1 y RPA, se cuantificaron los 53RBs calculando sus frecuencias como porcentajes por par de células, comparando células control de silenciamiento con células con SMC2 deplecionada, en ambos casos no tratadas y sometidas a estrés replicativo leve por tratamiento con APH 0.2  $\mu$ M durante 24 h (Figura 64C). La depleción de SMC2 disminuyó considerablemente la formación de 53RBs. En células no tratadas, se pasó de  $\approx 11\%$  en el control de silenciamiento al  $\approx 4\%$  en las células con SMC2 silenciado. Con APH, de  $\approx 17\%$  en el control de silenciamiento se redujeron a  $\approx 7\%$  en las células con SMC2 silenciado. Con estos resultados, se concluyó que la formación de 53RBs depende de la condensación cromosómica, del mismo modo que ocurre con la formación de 53BP1 NBs. El efecto de la APH siguió siendo perceptible con el silenciamiento de SMC2 y, por otra parte, la disminución en el porcentaje de 53RBs en las células con SMC2 silenciado respecto a las del control de silenciamiento fue equivalente entre el control no tratado y el tratamiento con APH, por lo que puede deducirse que el efecto de la depleción de SMC2 sobre la formación de 53RBs es independiente al del estrés replicativo leve.

- **Los defectos de condensación de la cromatina empeoran la formación del *midbody*:**

Por último, se analizó la formación de *midbodies*, como estructuras responsables de la activación de la mDDR. A partir de tinciones inmunofluorescentes de Aurora B y  $\alpha$ -Tubulina, se cuantificó su frecuencia como porcentaje de *midbodies* por par de células. La formación del *midbody* se vio considerablemente reducida con la depleción de SMC2 en comparación con el control de silenciamiento (Figura 64D). En células no tratadas, se pasó de una frecuencia de  $\approx 24\%$  en el control de silenciamiento a  $\approx 8\%$  con el silenciamiento de SMC2. En condiciones de estrés replicativo leve (tratamiento con APH 0.2  $\mu$ M durante 24 h), los resultados fueron análogos, ya que en ambos casos no se observaron diferencias significativas con las células no tratadas. Por tanto, se concluyó que la formación del *midbody* y, por extensión, la activación de la mDDR, requieren una correcta condensación cromosómica. Así pues, los defectos en la condensación cromosómica empeoran la mDDR en general.

### 3.4. La segregación cromosómica requiere una correcta condensación cromosómica

Como consecuencia de la alteración de la mDDR producida por los defectos de condensación cromosómica inducidos por la depleción de SMC2, se observaron también características propias de una segregación cromosómica defectuosa, directamente vinculada con fallos en la citocinesis.



**Figura 65 | Los defectos de condensación cromosómica empeoran la segregación cromosómica.** Se indujeron defectos de condensación cromosómica en células U2OS mediante depleción de la condensina SMC2 por RNAi con un siRNA (siSMC2). Las células se sembraron 48 h post-transfección. siCTRL, siRNA control (siCTRL Silencer Select); siSMC2, siRNA contra SMC2. **(A)** Cuantificación de UFBs (puentes ultrafinos, *ultra-fine bridges*) en inmunofluorescencias de PICH y BLM realizadas 24 h tras la siembra. Porcentaje de células mitóticas con un número determinado de UFBs, en categorías. Se analizaron 100 mitosis en cada una de 3 réplicas independientes. La depleción de SMC2 aumentó considerablemente la presencia de éstos en la mitosis. **(B)** Ejemplos representativos de UFBs en anafases de células control de silenciamiento y deplecionadas en SMC2, apreciándose su mayor abundancia en estas últimas. PICH, verde; BLM, rojo; ADN, azul (DAPI). **(C)** Cuantificación de células binucleadas en inmunofluorescencias de AURKB (*midbodies*) y α-Tubulina (citoplasmas) realizadas 48 h tras la siembra, con tratamientos con afidicolina (APH) 0.2 µM durante 24 h. Porcentaje de células binucleadas respecto del total de células. Se contabilizaron 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. El silenciamiento de SMC2 indujo considerablemente la binucleación, sin efecto apreciable de la APH. **(D)** Ejemplos representativos de citocinesis. α-Tubulina, verde; AURKB, rojo; núcleos, azul (DAPI). El control de silenciamiento presentó predominantemente núcleos independientes con *midbodies*. La depleción de SMC2 indujo binucleación y formación de *droplets* de DAPI conectados por largos puentes cromosómicos.

## • Los defectos de condensación cromosómica incrementan los UFBs:

Las células deplecionadas en SMC2 presentaron una mayor cantidad de UFBs (puentes ultrafinos, *ultra-fine bridges*) en sus mitosis en comparación con las células control de silenciamiento. A partir de tinciones inmunofluorescentes de UFBs, éstos se cuantificaron según el porcentaje de células mitóticas que presentaron un número concreto de ellos (0 a 5 y ≥6), en categorías, comparando ambas células en crecimiento exponencial (sin tratamientos adicionales) (Figura 65A). Las células mitóticas con SMC2 deplecionado mostraron en su mayoría un número considerable de UFBs (≥6) y

ninguna de ellas presentó ninguno. En cambio, las células control de silenciamiento mitóticas presentaron en su mayoría muy pocos UFBs (ninguno o sólo uno), no detectándose ninguna con más de 5. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Lukas C. *et al.*, 2011.

Los UFBs se detectaron por tinción inmunofluorescente de las helicasas BLM y PICH, marcadores de estas estructuras negativas al DAPI, usando el protocolo de inmunofluorescencia para proteínas cinetocóricas. En la Figura 65B se muestran ejemplos de ellos. Los UFBs se observaron en anafases, en las que se cree que contienen secuencias centroméricas concatenadas de cromátidas hermanas. En las células control de silenciamiento mitóticas, su número, en caso de estar presentes, fue siempre bajo. En las células con SMC2 silenciado, los defectos de condensación cromosómica fueron evidentes incluso al DAPI, ya que en las células mitóticas ni siquiera se llegaron a observar los cromosomas bien definidos, apareciendo siempre difusos. En estas células, las anafases rara vez mostraron una separación clara de los dos conjuntos cromosómicos, que permanecieron siempre interconectados por un gran número de UFBs (generalmente, mucho mayor de 6), lo cual es indicativo de severos problemas de segregación cromosómica.

- **Los defectos de condensación cromosómica incrementan la binucleación:**

El silenciamiento de SMC2 originó una mayor cantidad de células binucleadas en comparación con el control de silenciamiento. La binucleación se cuantificó a partir de tinciones inmunofluorescentes de Aurora B (marcador de *midbodies*, que aparecen cuando no se origina binucleación) y  $\alpha$ -Tubulina (para diferenciar el citoplasma de cada célula individual), con especial atención a los núcleos teñidos con DAPI, determinándose el porcentaje de células binucleadas respecto del total de células contadas (Figura 65C). La binucleación en las células control de silenciamiento ( $\approx 5\%$ ) se incrementó considerablemente en las células con SMC2 silenciado ( $\approx 21\%$ ), sin aplicar tratamientos adicionales. Al inducir estrés replicativo leve por tratamiento con APH 0.2  $\mu\text{M}$  durante 24 h, los resultados fueron similares, ya que no se apreciaron diferencias significativas entre este tratamiento y los controles no tratados, de forma coherente a como ocurría con la formación de *midbodies*.

En la Figura 65D se compara la citocinesis entre células control de silenciamiento y células deplecionadas para SMC2. En el control, la mayoría de citocinesis fueron normales, separándose los dos núcleos hijos, presentes en citoplasmas independientes, y con formación evidente de *midbodies* separándolos. Al silenciar SMC2, se observó una gran cantidad de células binucleadas, compartiendo ambos núcleos un citoplasma común y sin formación del *midbody*. Llamó especialmente la atención la presencia de gran cantidad de núcleos formando *droplets* de DAPI, conectados por largos puentes cromosómicos. Esto último puso de manifiesto que los defectos en condensación cromosómica generaron defectos en segregación cromosómica, los cuales finalmente acabaron dando lugar a



citocinesis defectuosas. Estos resultados están acorde con los defectos en la mDDR, especialmente con la reducción del ensamblaje de *midbodies*, observados con los defectos de condensación cromosómica.

## 4. Interacciones entre la citocinesis y la DDR

### 4.1. La inhibición anafásica de Aurora B, pero no de PLK1, dispara la DDR en la próxima fase G1

Nuestro modelo de la mDDR establece una relación directa de esta DDR en concreto con la citocinesis. Con el objetivo de identificar otras relaciones posibles entre la DDR en general y la citocinesis, se estudiaron los efectos de la inhibición en anafase de las principales proteínas que orquestan ambos procesos sobre la DDR en la próxima fase G1, cuantificando esta última atendiendo al número de focos de 53BP1 formados en las células.

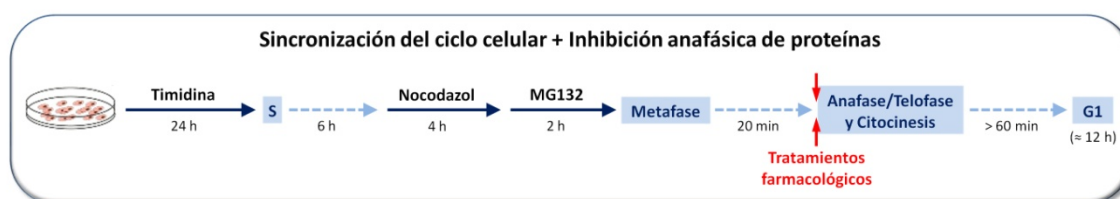
Para ello, se llevó a cabo una sincronización celular para inhibición anafásica en células U2OS, siguiendo el protocolo descrito en el apartado correspondiente de la sección de Materiales y Métodos, el cual se esquematiza en la Figura 66A. Las inhibiciones específicas en anafase se aplicaron sobre proteínas de la DDR (ATM, ATR, CHK1 y TOPO-II) y proteínas responsables de la citocinesis (Aurora B y PLK1), introduciéndose además un tratamiento de inhibición sostenida de TOPO-II a lo largo de todo el proceso. Las inhibiciones se mantuvieron durante 10 h, desde anafase hasta la próxima fase G1, momento en el que las células fueron fijadas y teñidas inmunofluorescentemente para 53BP1. Los resultados se analizaron por microscopía de alto rendimiento (HTM), contabilizándose el número de focos de 53BP1 por núcleo (Figura 66B). Se observaron los siguientes efectos:

- Las inhibiciones anafásicas de ATM (con KU-55933 10  $\mu$ M) y ATR (con ETP464 5  $\mu$ M) dieron lugar a la generación de un mayor número de focos de 53BP1, esto es, provocaron un aumento en la DDR, en la siguiente fase G1, en comparación con los controles (no tratado y tratado con DMSO como control de solvente). Este efecto resultó equivalente en ambas inhibiciones. La inhibición de cada una de ellas por separado provocó un aumento de DSBs endógenas, que serían reconocidas y señalizadas por efecto de la otra PIKK activa.
- La inhibición anafásica de ambas PIKKs (ATM y ATR) conjuntamente (con cafeína 5 mM, inhibidor genérico de PIKKs) provocó una reducción en el número de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1 con respecto a los controles. En este caso, la DDR se vio completamente inhibida, al suprimirse la actividad de ambas PIKKs.
- La inhibición anafásica de CHK1 (con UCN01 300 nM) también incrementó el número de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1 con respecto a los controles. Este incremento en la DDR fue mayor que el ocasionado con las inhibiciones de las PIKKs. Esto indicaría que esta

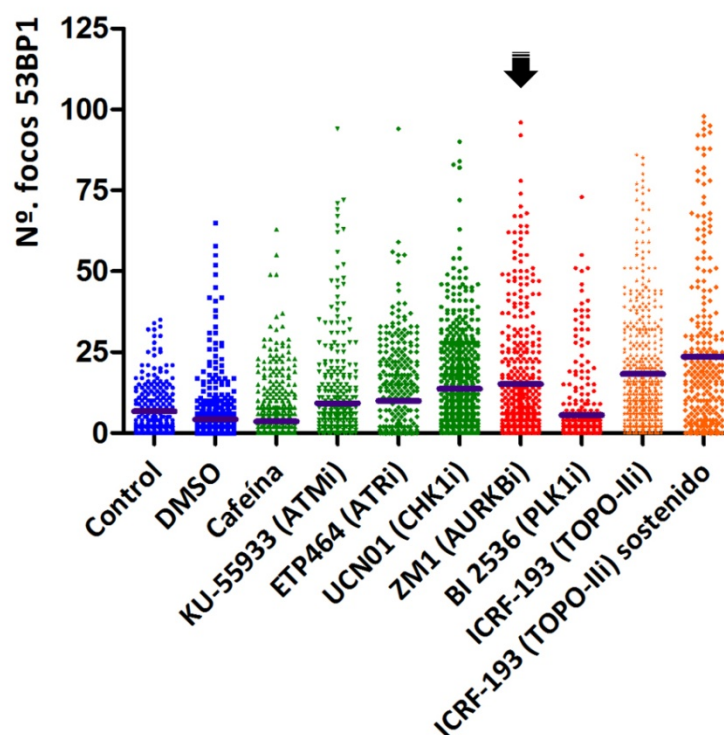


kinasa efectora de *checkpoint* tendría un papel especialmente relevante en la respuesta al daño endógeno en el ADN originado en mitosis.

A



B



**Figura 66 | Efectos de la inhibición anafásica de proteínas de la DDR y de la citocinesis sobre la DDR en la siguiente fase G1.** (A) Esquema del protocolo de sincronización celular para inhibiciones anafásicas, utilizado con células U2OS. Los tratamientos con las distintas drogas se administraron justo en anafase y se mantuvieron durante 10 h hasta la próxima fase G1. Se aplicó además un tratamiento sostenido con ICRF-193 a lo largo de todo el proceso. Concentraciones de uso: Cafeína, 5 mM; KU-55933, 10  $\mu$ M; ETP464, 5  $\mu$ M; UCN01, 300 nM; ZM1, 2  $\mu$ M; BI 2536, 100 nM; ICRF-193, 5  $\mu$ M. DMSO, control de solvente. (B) Cuantificación por microscopía de alto rendimiento (HTM) de la formación de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1, a partir de inmunofluorescencia para HTM de 53BP1 con DAPI (núcleos). La gráfica representa el número de focos de 53BP1 por núcleo, estando representado cada uno de éstos por un punto. En el eje X se muestran los tratamientos administrados (i = inhibidor). Las medias se indican con líneas azul oscuro. Las inhibiciones anafásicas de las proteínas de la DDR (ATM, ATR, CHK1 y TOPO-II) y de la proteína de la citocinesis AURKB (señalada por la flecha) generaron un aumento de los focos de 53BP1 respecto a los controles, efecto que no se dio con PLK1, otra proteína implicada en citocinesis.

- La inhibición anafásica de TOPO-II (con ICRF-193 5  $\mu$ M) provocó un aumento considerable en el número de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1 en comparación con los controles. Esta sobreactivación de la DDR, la mayor de las observadas con los tratamientos, se debe a que, de por sí, los inhibidores catalíticos de TOPO-II generan DSBs. El efecto resultó algo mayor en la inhibición sostenida de TOPO-II.

- La inhibición anafásica de AURKB (con ZM1 2  $\mu$ M) generó un aumento muy evidente en el número de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1 respecto a los controles. Este disparo de la DDR resultó incluso notablemente mayor que el ocasionado por inhibición de las PIKKs, ligeramente mayor que el de la inhibición de CHK1 y menor que el originado con la inhibición de TOPO-II. Este resultado implica que la inhibición anafásica de esta proteína implicada en la citocinesis y en la formación del *midbody* tiene consecuencias drásticas en la generación de daño endógeno en el ADN cuando se completa la división celular, lo que le asignaría directamente un papel en la DDR. En concreto, y atendiendo a los resultados presentados hasta ahora, éste sería el de activar la mDDR en citocinesis. Si Aurora B es inhibida en anafase, en citocinesis no se produciría la activación de la mDDR (ni la generación de 53RBs), lo que redundaría en la aparición de daño en el ADN en la siguiente fase G1, el cual provocaría un disparo de la DDR genérica en todo el núcleo (formación de focos de 53BP1 ante DSBs).
- Por último, la inhibición anafásica de PLK1 (con BI 2536 100 nM), curiosamente y a pesar de tratarse de otra proteína implicada en citocinesis, no provocó un aumento en la formación de focos de 53BP1 en la siguiente fase G1 respecto a los controles. Esto indicaría que, aunque podría ser importante junto a Aurora B para la citocinesis y la mDDR, su inhibición no repercutiría directamente en la generación de daño endógeno y la activación de la DDR en la siguiente fase G1.

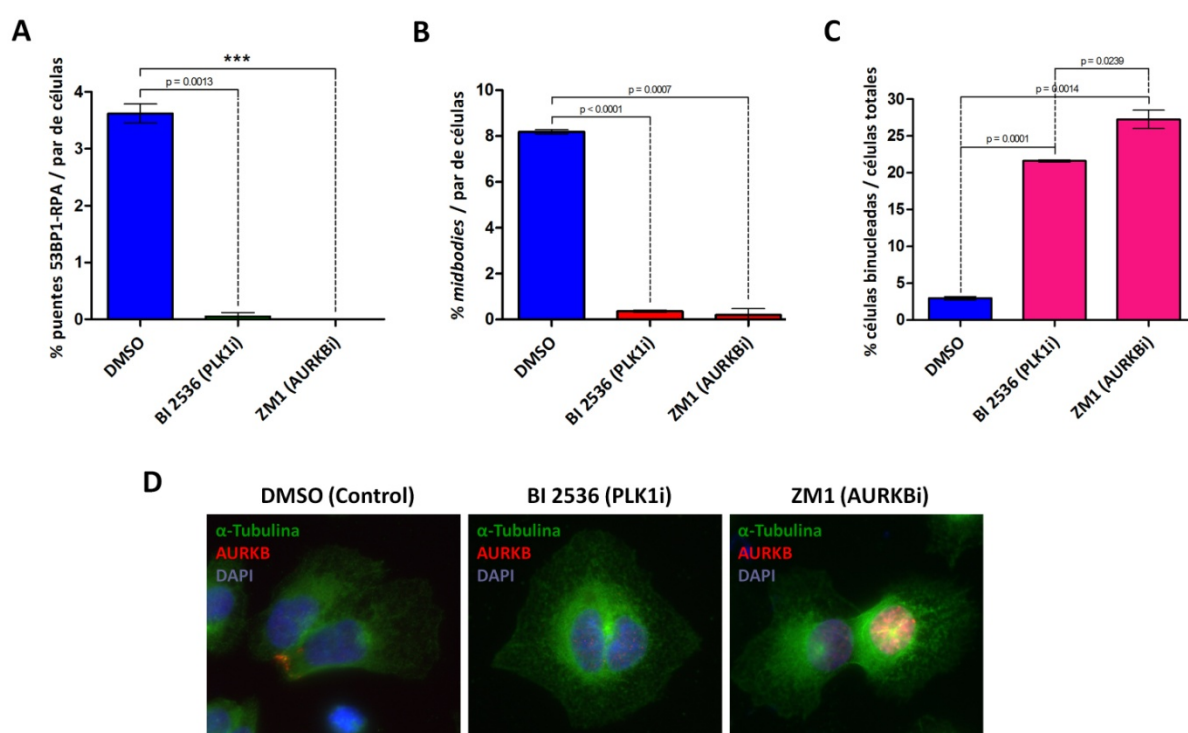
## 4.2. La mDDR depende de Aurora B y PLK1

Una vez comprobada la contribución de las proteínas de citocinesis Aurora B y PLK1 a la DDR genérica, se trató de concretar el posible papel de éstas en la mDDR. Para ello, usando células U2OS, se inhibieron específicamente en anafase con ZM1 2  $\mu$ M (inhibidor de Aurora B, AURKBi) y BI 2536 100 nM (inhibidor de PLK1, PLK1i), manteniéndose esta inhibición durante 10 h hasta la siguiente fase G1, donde se analizaron parámetros relacionados con la mDDR: Formación de 53RBs, ensamblaje del *midbody* y binucleación. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- La formación de 53RBs se analizó a partir de inmunofluorescencia de éstos para 53BP1 y RPA, habiendo aplicado previamente sincronización celular con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como porcentaje de 53RBs por par de células (Figura 67A). La inhibición tanto de PLK1 como de Aurora B redujo casi por completo la formación de 53RBs con respecto al control (DMSO, control de solvente).
- El ensamblaje del *midbody* se analizó a partir de inmunofluorescencia de Aurora B (*midbodies*) y  $\alpha$ -Tubulina (citoplasmas), habiendo aplicado previamente sincronización celular por *shake-off* mitótico con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como

porcentaje de *midbodies* por par de células (Figura 67B). La inhibición tanto de PLK1 como de Aurora B prácticamente suprimió el ensamblaje del *midbody* con respecto al control, al igual que ocurrió con los 53RBs.

- La binucleación se analizó a partir de la misma inmunofluorescencia de Aurora B (*midbodies*) y  $\alpha$ -Tubulina (citoplasmas), reconociendo los núcleos por su tinción con DAPI, habiendo aplicado previamente sincronización celular por *shake-off* mitótico con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como porcentaje de células binucleadas respecto del total de células (Figura 67C). La binucleación existente de forma normal en el control no tratado ( $\approx 3\%$ ) se incrementó drásticamente tanto con la inhibición de PLK1 ( $\approx 22\%$ ) como con la de Aurora B ( $\approx 27\%$ ), de forma opuesta a lo que se observó para los *midbodies* y los 53RBs. Aunque las diferencias entre la inhibición de PLK1 y de Aurora B resultaron significativas, cualitativamente fueron resultados equivalentes. Algunos ejemplos de estos casos de binucleación se muestran en la Figura 67D.

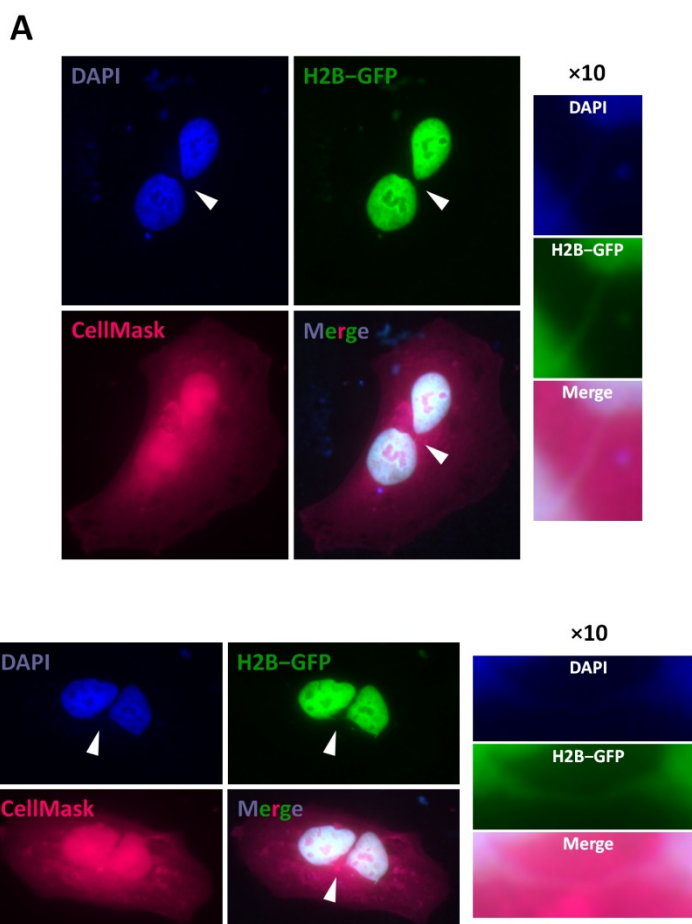


**Figura 67 | Dependencia de la mDDR y la citocinesis de Aurora B y PLK1.** Inhibición específica en anafase de PLK1 (con BI 2536 100 nM, PLK1i) y AURKB (con ZM1 2  $\mu$ M, AURKBi) en células U2OS. DMSO, control de solvente. Los tratamientos se mantuvieron durante 10 h, hasta la siguiente fase G1, donde las células se fijaron y se efectuaron tinciones inmunofluorescentes de 53RBs (53BP1 y RPA) y de *midbodies* (AURKB y  $\alpha$ -Tubulina) marcando los núcleos con DAPI. Se analizaron 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. **(A)** Cuantificación de la formación de 53RBs. Frecuencias en porcentajes de 53RBs por par de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB la redujeron casi por completo. **(B)** Cuantificación del ensamblaje del *midbody*. Frecuencias en porcentajes de *midbodies* por par de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB lo suprimieron también casi totalmente. **(C)** Cuantificación de la binucleación. Frecuencias en porcentajes de células binucleadas respecto del total de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB la aumentaron drásticamente. **(D)** Imágenes de inmunofluorescencia representativas de la citocinesis en los diferentes tratamientos.  $\alpha$ -Tubulina, verde; AURKB, rojo; núcleos, azul (DAPI). En el control con DMSO los núcleos aparecen en citoplasmas independientes y se aprecia el *midbody*. Al inhibir PLK1 o AURKB se generan muchas células binucleadas.

De conjunto, estos resultados mostraron que al inhibir PLK1 o Aurora B se produjo una eliminación casi total del ensamblaje del *midbody*, lo que conllevó la eliminación casi total de los 53RBs, esto es, de la mDDR, y tuvo como consecuencia el aumento drástico de la binucleación. Estas relaciones muestran que existe un vínculo entre la mDDR y la citocinesis. Para que esta última se dé, se necesita que haya mDDR, con lo que el *checkpoint* de abscisión citocinética llevaría asociada la mDDR. En conclusión, Aurora B y PLK1 son necesarias para la mDDR, que depende de ambas, y, por tanto, para la correcta citocinesis. Si alguna de estas proteínas es inhibida en anafase, ambos procesos quedan suprimidos.

### 4.3. Puentes cromosómicos intracelulares conectan algunos binúcleos en células tetraploides

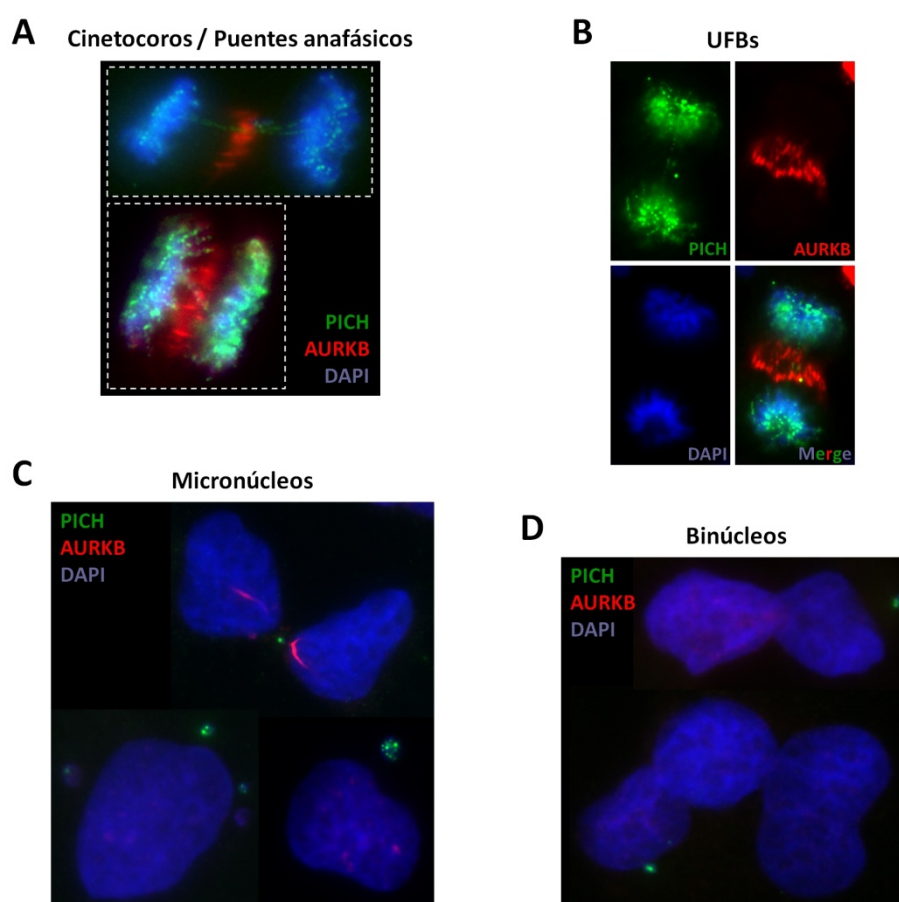
Hasta ahora, hemos descrito la existencia de una relación funcional entre la mDDR y la citocinesis. Ante la cuestión de si podría existir alguna prueba a nivel estructural que demuestre esta relación, se trató de encontrar alguna estructura celular indicativa de ello. Con este fin, se realizó un exhaustivo análisis de las células binucleadas obtenidas por inhibición anafásica de Aurora B (con ZM1 2  $\mu$ M) en células sincronizadas por *shake-off* mitótico. Se empleó una línea celular U2OS que expresa de forma constitutiva H2B-GFP, previamente generada en nuestro laboratorio, a fin de facilitar la observación del ADN. Tras 10 h de tratamiento, en la siguiente fase G1, las células se fijaron y se efectuó una tinción inmunofluorescente de citoplasma y núcleo, con HCS



**Figura 68 | Puentes cromosómicos intracelulares conectando los binúcleos de células tetraploides.** Las células binucleadas se obtuvieron por inhibición anafásica de AURKB (con ZM1 2  $\mu$ M) en células U2OS expresando H2B-GFP (verde) sincronizadas por *shake-off* mitótico. Los tratamientos se mantuvieron durante 10 h, hasta la siguiente fase G1, donde las células fueron fijadas y teñidas para la detección fluorescente de citoplasma, con HCS CellMask™ Deep Red (magenta), y de núcleos, con DAPI (azul). **(A)** y **(B)** Ejemplos característicos de puentes cromosómicos intracelulares (señalados por flechas) en células binucleadas compartiendo un citoplasma común. A la derecha, se muestran en detalle aplicando un zoom  $\times 10$ .

CellMask™ Deep Red marcando los primeros y DAPI los segundos. En algunas células binucleadas, tetraploides, compartiendo un único citoplasma, se observó la presencia de finísimos puentes de DAPI y, más visiblemente, H2B–GFP, interconectando sus binúcleos (Figura 68A y B). Estos puentes cromosómicos intracelulares e “interbinucleares” suponen una evidencia citológica de que la binucleación podría resultar de puentes cromosómicos de ADN no resueltos, reforzando ello la relación existente entre la mDDR y la citocinesis.

Se trató también de detectar posibles puentes de ADN no visibles al DAPI conectando los binúcleos, como es el caso de los UFBs (puentes ultrafinos), detectables por inmunofluorescencia de PICH o BLM, helicasas que se unen a estas secuencias de ADN centromérico mal segregado. Se realizaron tinciones inmunofluorescentes de PICH, detectándose en los cinetocoros y puentes anafásicos (Figura 69A), en los UFBs (Figura 69B) y en los micronúcleos (Figura 69C). No obstante, en ningún caso se detectaron puentes de PICH interconectando los binúcleos (Figura 69D), aunque no puede descartarse que pueda estar presente en los puentes cromosómicos intracelulares.



**Figura 69 | Ausencia de PICH interconectando los binúcleos.** Tinciones inmunofluorescentes de PICH (verde) y AURKB (rojo), con el ADN teñido con DAPI (azul), en células U2OS. PICH se encontró presente en cinetocoros y puentes anafásicos (A), UFBs (puentes ultrafinos) (B) y micronúcleos (C), pero en ningún caso interconectando binúcleos (D).



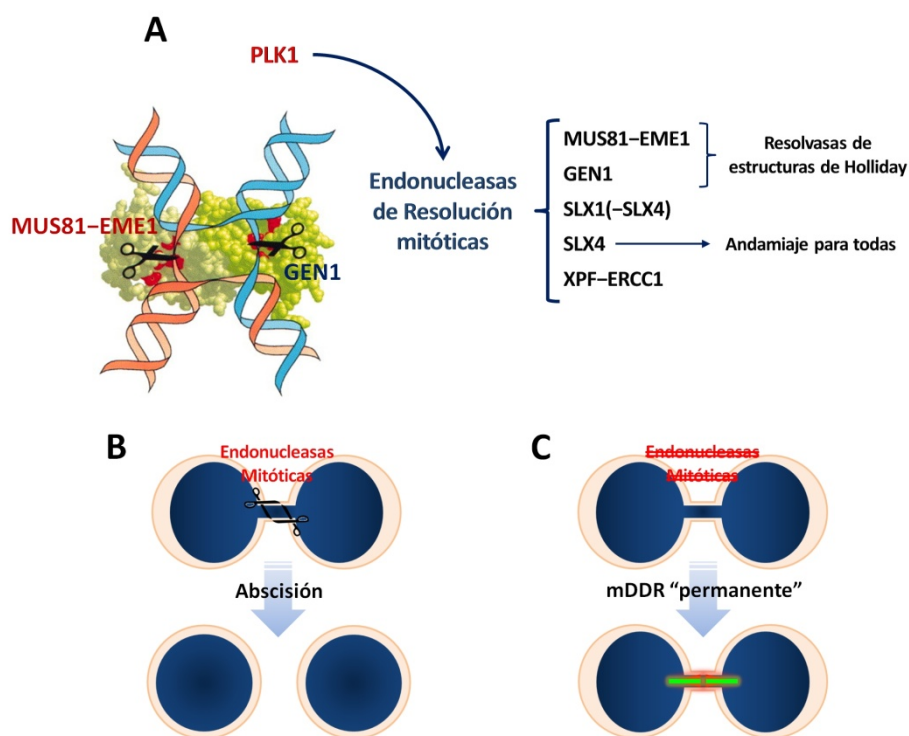
## 5. Participación de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR

### 5.1. Hipótesis sobre el papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR

Al estudiar las proteínas de la DDR que colocalizaban con el *midbody*, dos de las que más llamaron la atención fueron MUS81 (sensible a MMS y UV 81, *MMS- and UV-sensitive 81*) y GEN1 (endonucleasa similar a XPG, *XPG-like endonuclease*), las endonucleasas de resolución (resolvasas) mitóticas encargadas de la resolución de las estructuras de Holliday dobles (dHJs) en la reparación por recombinación homóloga. Como ya se comentó en los apartados correspondientes de la Introducción, además de MUS81–EME1 y GEN1, otras endonucleasas de resolución mitóticas incluyen a SLX1(–SLX4) (letal sintético de función desconocida, *synthetic lethal of unknown function*), SLX4 (que actúa de proteína de andamiaje sobre la que se posicionan todas ellas (Fekairi *et al.*, 2009)) y XPF–ERCC1 (Figura 70A). Sin embargo, MUS81 y GEN1 adquirirían una importancia clave en la mDDR, ya que se ha descrito que PLK1 las activa específicamente en mitosis (Matos *et al.*, 2011). Por otra parte, la reparación de los puentes cromosómicos por recombinación homóloga puede llevarse a cabo por dos vías. La vía de disolución (por el complejo BTR, BLM–TOPO–III $\alpha$ –RMI1/2) está constitutivamente activa a lo largo de todo el ciclo celular. La vía de resolución sólo se activa en mitosis: MUS81, desde final de G2 hasta que concluye la mitosis; GEN1, sólo al final de mitosis.

Por tanto, considerando que MUS81 y GEN1 están presentes en el *midbody*; que se trata de proteínas específicas de reparación asociadas a los últimos pasos de la recombinación homóloga (cuya presencia se ha demostrado en los 53RBs, como hemos visto); que son activadas por PLK1 (de la cual dependen en parte la mDDR y la citocinesis); y que esta activación se produce en los últimos estadios de la división celular (cuando tiene lugar la citocinesis), podemos pensar en ellas como el posible paso final del mecanismo reparador de puentes cromosómicos que es disparado por la mDDR. Según esta hipótesis, si las endonucleasas de resolución mitóticas están activas, podrán actuar resolviendo los puentes cromosómicos presentes entre las dos células hijas en citocinesis y tendría lugar la abscisión citocinética, al satisfacerse el *checkpoint* de abscisión (Figura 70B). En el caso de que las endonucleasas de resolución mitóticas no estuvieran funcionando, los puentes cromosómicos entre las dos células hijas en citocinesis no se resolverían y la abscisión citocinética no tendría lugar al no superarse el *checkpoint* de abscisión. La mDDR quedaría activada de forma “permanente” al no tener lugar el paso final de reparación, con lo cual la presencia del *midbody* y del 53RB sería persistente (Figura 70C).

En lo referente a la ruta de activación de estas endonucleasas de resolución mitóticas, considerando que actúan en la mDDR, que ésta depende de Aurora B y de PLK1, y que se ha demostrado que PLK1 las activa, podemos hipotetizar que, en la mDDR, Aurora B activaría a PLK1 y ésta a las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1.



**Figura 70 | Posible papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR. (A)** PLK1 activa a las endonucleasas de resolución mitóticas, en concreto a MUS81 y GEN1, las resolvasas de las estructuras de Holliday dobles (dHJs) que se originan en la reparación por HR. **(B)** En la mDDR, las endonucleasas de resolución mitóticas actuarían resolviendo los puentes cromosómicos, lo que permitiría que la absolución tuviera lugar al superarse el *checkpoint* de absolución. **(C)** Si se suprimiera la actividad de las endonucleasas de resolución mitóticas, los puentes cromosómicos no se resolverían y la absolución no tendría lugar al no satisfacerse el *checkpoint* de absolución. La mDDR quedaría activa "permanentemente" al no tener lugar el paso final de la reparación, persistiendo el *midbody* (en rojo) y los 53RBs (en verde) en el puente cromosómico.

## 5.2. La depleción de las endonucleasas de resolución mitóticas sobreactiva la mDDR y empeora la citocinesis

Para verificar nuestra hipótesis sobre la participación de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR, el primer abordaje experimental que se utilizó consistió en la depleción de éstas en células U2OS mediante RNAi con siRNAs (previamente verificados en nuestro laboratorio) contra MUS81 (siMUS81), GEN1 (siGEN1) y SLX4 (siSLX4), ya que esta última actúa como plataforma de andamiaje para éstas y las demás endonucleasas de resolución. Se realizaron además el silenciamiento doble (siMUS81 + siGEN1) y el triple (siMUS81 + siGEN1 + siSLX4). En los experimentos, se incluyó también el silenciamiento de la helicasa BLM (siBLM), a fin de comparar su efecto con el de las endonucleasas. Se introdujeron además tratamientos de inducción de estrés replicativo leve con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante 24 h, con el propósito de comparar su efecto con las condiciones normales sin tratamiento.



- **Sobreactivación de la mDDR con el *knock-down* de las endonucleasas mitóticas:**

En primer lugar, se analizó la formación de 53RBs como marcador de la activación persistente de la mDDR. A partir de inmunofluorescencias de 53RBs, se cuantificó la formación de éstos en porcentajes de 53RBs por par de células (Figura 71A).

En condiciones normales (sin APH), no se apreciaron diferencias significativas entre los controles (células U2OS sin ningún tratamiento con siRNAs y células U2OS control de silenciamiento, siCTRL ON-TARGET*plus*), los silenciamientos simples de MUS81 y GEN1, y el silenciamiento doble de éstas, si bien sí se apreció un ligero incremento en la formación de 53RBs con el silenciamiento simple de SLX4 y, especialmente, con el triple silenciamiento de las endonucleasas. Este incremento no llegó a ser tan pronunciado como el ocasionado por el silenciamiento de BLM.

En cambio, en condiciones de estrés replicativo leve (con APH), el efecto inductor de la formación de 53RBs resultó significativamente mayor en todos los silenciamientos en comparación con los controles. El incremento en la formación de 53RBs resultó similar en los silenciamientos simples de MUS81 y GEN1, y en el combinado de ambas, lo que indica que sus efectos no son aditivos, posiblemente porque actúan conjuntamente en una misma vía de resolución. El incremento causado por el silenciamiento simple de SLX4 fue equivalente al del triple silenciamiento, lo que indica que la eliminación de la proteína de andamiaje suprime a las otras dos, y en ambos casos resultó mayor que en los demás silenciamientos, de lo que se deduce que en la resolución de los puentes cromosómicos podrían estar actuando en menor medida otras endonucleasas de resolución diferentes a MUS81 y GEN1, pero también dependientes de SLX4. En estas condiciones, la inducción en la formación de 53RBs causada por el silenciamiento de BLM resultó equivalente a la obtenida con el silenciamiento de SLX4 y el triple silenciamiento, pero no fue significativa con respecto al no tratamiento, lo que indicaría que la vía de disolución para la reparación de los puentes cromosómicos actúa de modo independiente a la presencia de estrés replicativo.

Estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis sobre el papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR, así como con nuestra predicción acerca de los efectos de su inactivación. Su depleción ocasionó un incremento en la formación de 53RBs especialmente en condiciones de estrés replicativo leve, lo que se traduce en una sobreactivación de la mDDR de modo “persistente”, al suprimirse el paso final de reparación de los puentes cromosómicos. En los 53RBs se estarían produciendo todos los pasos de la reparación (colapso de horquillas de replicación atascadas, generación de DSBs, resección, HR inicial), pero no el último de ellos, la resolución. Podría establecerse un símil de estos 53RBs con “cicatrices” de lesiones en el ADN en los puentes cromosómicos, que quedan de este modo “marcadas” a la espera de una posible reparación.

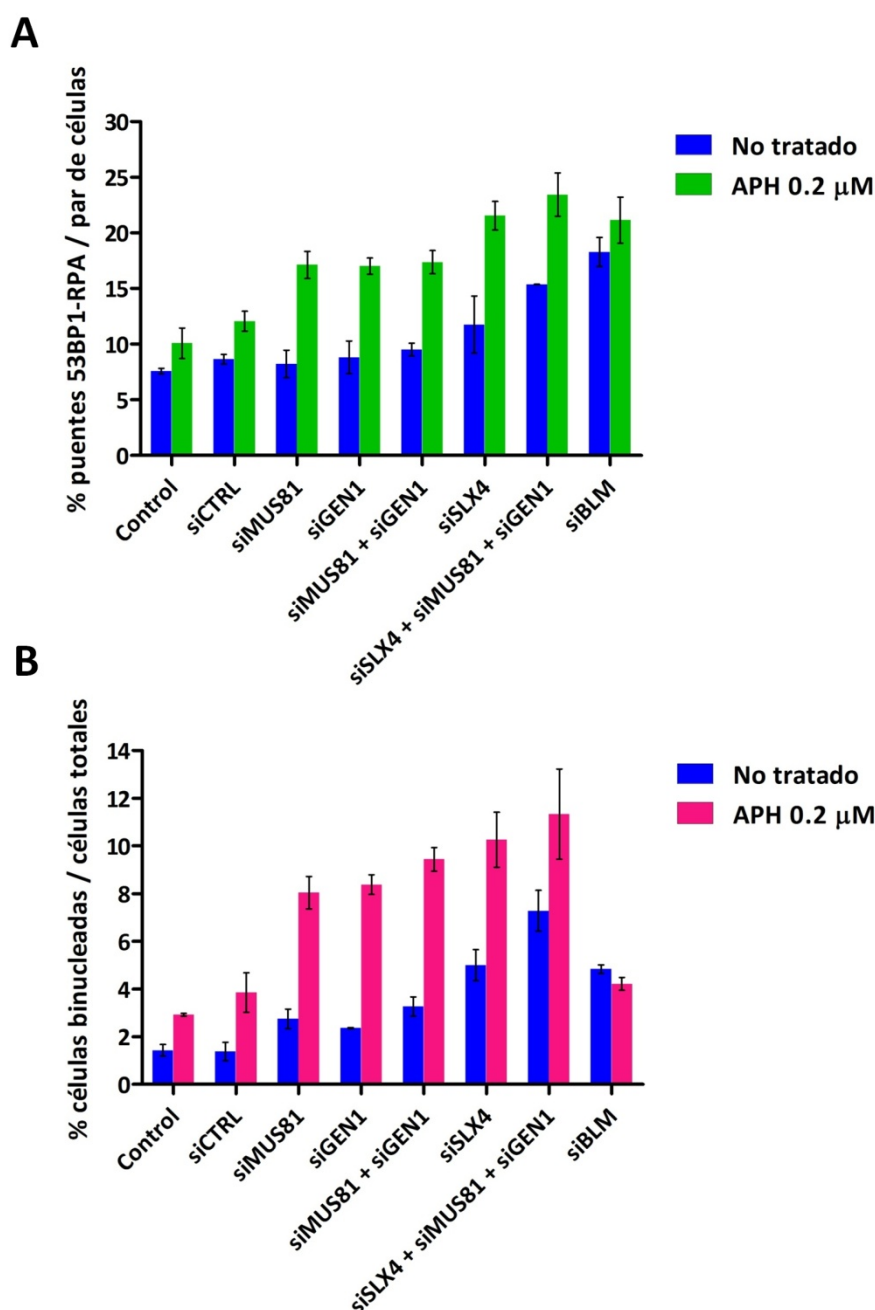
- **Defectos en citocinesis con el *knock-down* de las endonucleasas mitóticas:**

Complementando el experimento anterior, se analizó la binucleación como marcador de defectos en citocinesis. A partir de inmunofluorescencias de Aurora B (*midbodies*) y  $\alpha$ -Tubulina (citoplasmas), clasificando los núcleos teñidos con DAPI, se cuantificó la binucleación en porcentajes de células binucleadas respecto del total de células (Figura 71B). Los resultados obtenidos fueron análogos a los observados para la formación de 53RBs.

En condiciones normales (sin APH), existió cierto incremento leve en la binucleación con los silenciamientos simples de MUS81 y GEN1, y con su doble silenciamiento, en los tres casos equivalente, respecto a los controles. El silenciamiento simple de SLX4 tuvo un efecto mayor, y más aún el triple silenciamiento. Por su parte, el silenciamiento de BLM también ocasionó un aumento de la binucleación, que se situó a niveles similares a los del silenciamiento simple de SLX4.

En condiciones de estrés replicativo leve (con APH), el incremento de la binucleación fue mucho más pronunciado en cada caso. Ésta fue mayor incluso en los controles en comparación con el no-tratamiento, lo que indica que, de por sí, el estrés replicativo leve es capaz de causar defectos en citocinesis, constituyendo esto otra muestra más de la conexión entre la DDR con la citocinesis. Los silenciamientos simples de MUS81 y GEN1, y su silenciamiento conjunto incrementaron la binucleación a niveles similares y prácticamente del doble con respecto a los controles. El aumento de binucleación causado por el silenciamiento simple de SLX4 fue ligeramente mayor a los anteriores, aunque esta diferencia no resultó significativa. El triple silenciamiento también generó un incremento de binucleación ligeramente mayor al obtenido con el silenciamiento anterior, y por tanto el más alto obtenido. Curiosamente, en el silenciamiento de BLM no se detectaron diferencias significativas con el no-tratamiento, lo que indicaría que la abscisión citocinética no depende tanto de BLM como de las endonucleasas de resolución mitóticas, que representarían el principal vínculo entre la reparación de los puentes cromosómicos y la correcta citocinesis.

El incremento de binucleación causado por el silenciamiento de las endonucleasas de resolución mitóticas supondría la aparición de defectos en citocinesis como consecuencia de éste. Al no llegarse a reparar el daño, el puente cromosómico persiste con la lesión y con su mDDR activada, y la abscisión en principio se vería impedida por la actuación del *checkpoint* de abscisión. Sin embargo, este *checkpoint*, aunque previene la abscisión en presencia de puentes cromosómicos no resueltos, no detiene la progresión del ciclo celular, con lo que es probable que finalmente tenga lugar su “colapso” conforme la célula avanza en el ciclo, aunque los puentes cromosómicos sigan sin resolverse debido a la ausencia de las endonucleasas de resolución. Esto daría lugar, como está descrito para las células de vertebrados, a la regresión del surco de división con la subsecuente binucleación y tetraploidización celular.



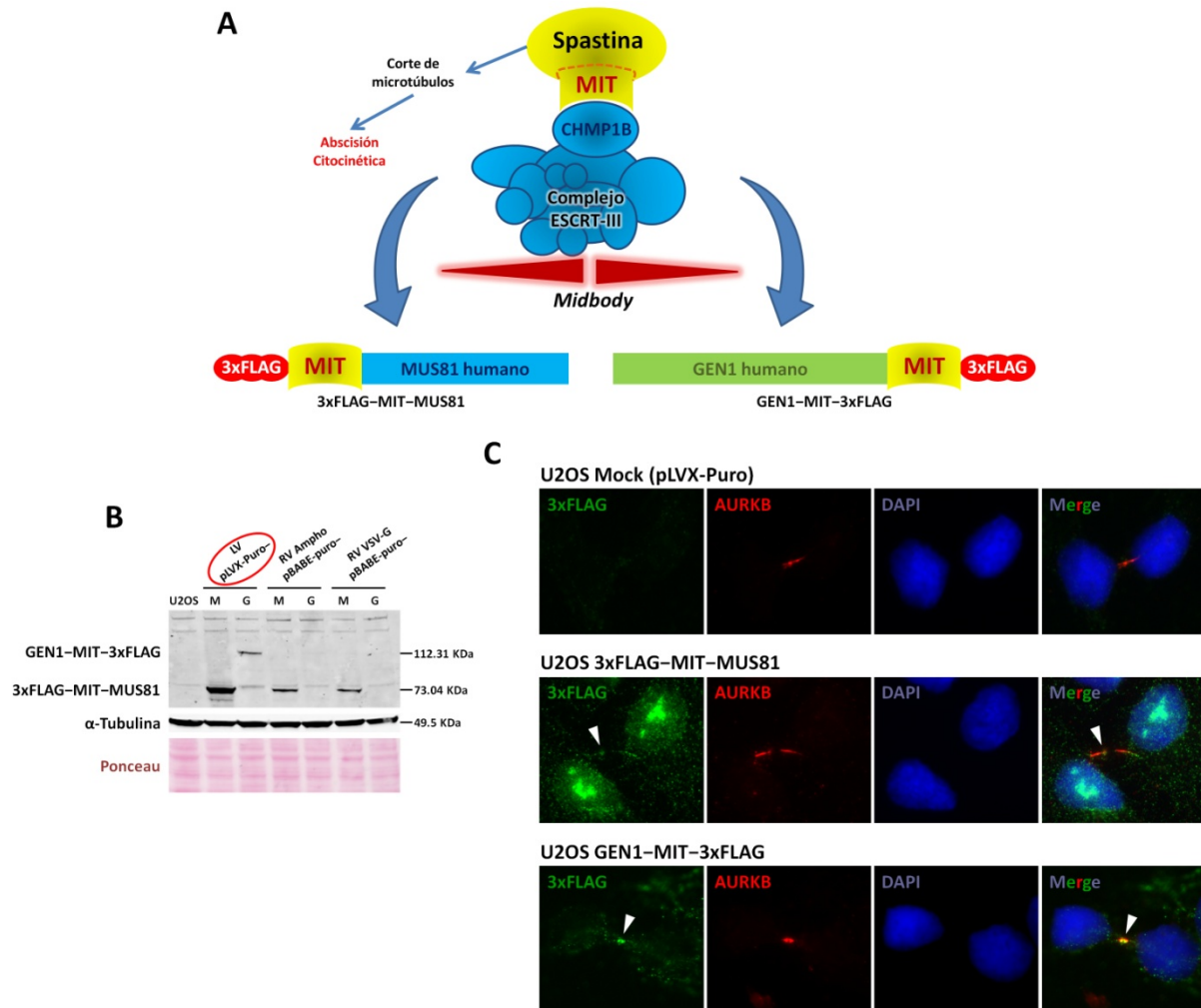
**Figura 71 | Efectos del silenciamiento de las endonucleasas de resolución mitóticas sobre la activación de la mDDR y la citocinesis.** Las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81, GEN1 y SLX4 se silenciaron en células U2OS mediante RNAi con siRNAs contra ellas (siMUS81, siGEN1 y siSLX4). Se realizaron también el silenciamiento doble de MUS81 y GEN1 (siMUS81 + siGEN1) y el triple silenciamiento (siSLX4 + siMUS81 + siGEN1). En el experimento se introdujo también el silenciamiento de la helicasa BLM (siBLM). Control, células sin tratamiento alguno; siCTRL, siRNA control (siCTRL ON-TARGET<sup>plus</sup>). Las células se sembraron 48 h post-transfección y 24 h después se aplicaron tratamientos con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante otras 24 h para inducir estrés replicativo leve. Seguidamente, se fijaron y se tiñeron para inmunofluorescencia. Las cuantificaciones se realizaron contabilizando 350-500 núcleos en 3 réplicas independientes. **(A)** Cuantificación de 53RBs en inmunofluorescencias de 53BP1 y RPA. Frecuencias en porcentajes de 53RBs por par de células. El silenciamiento de las endonucleasas de resolución mitóticas incrementó la formación de 53RBs especialmente en condiciones de estrés replicativo leve, lo que supone una sobreactivación de la mDDR de forma “permanente” al no resolverse los puentes cromosómicos. El silenciamiento de BLM también lo hizo, pero sin presentar diferencias en condiciones de estrés replicativo. **(B)** Cuantificación de la binucleación en inmunofluorescencias de AURKB y  $\alpha$ -Tubulina, analizando los núcleos teñidos con DAPI. Frecuencias en porcentajes de células binucleadas respecto del total de células. Se obtuvieron resultados análogos a los anteriores, aunque el silenciamiento de BLM no tuvo un efecto tan pronunciado en la binucleación.

### 5.3. Estrategia para la concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*

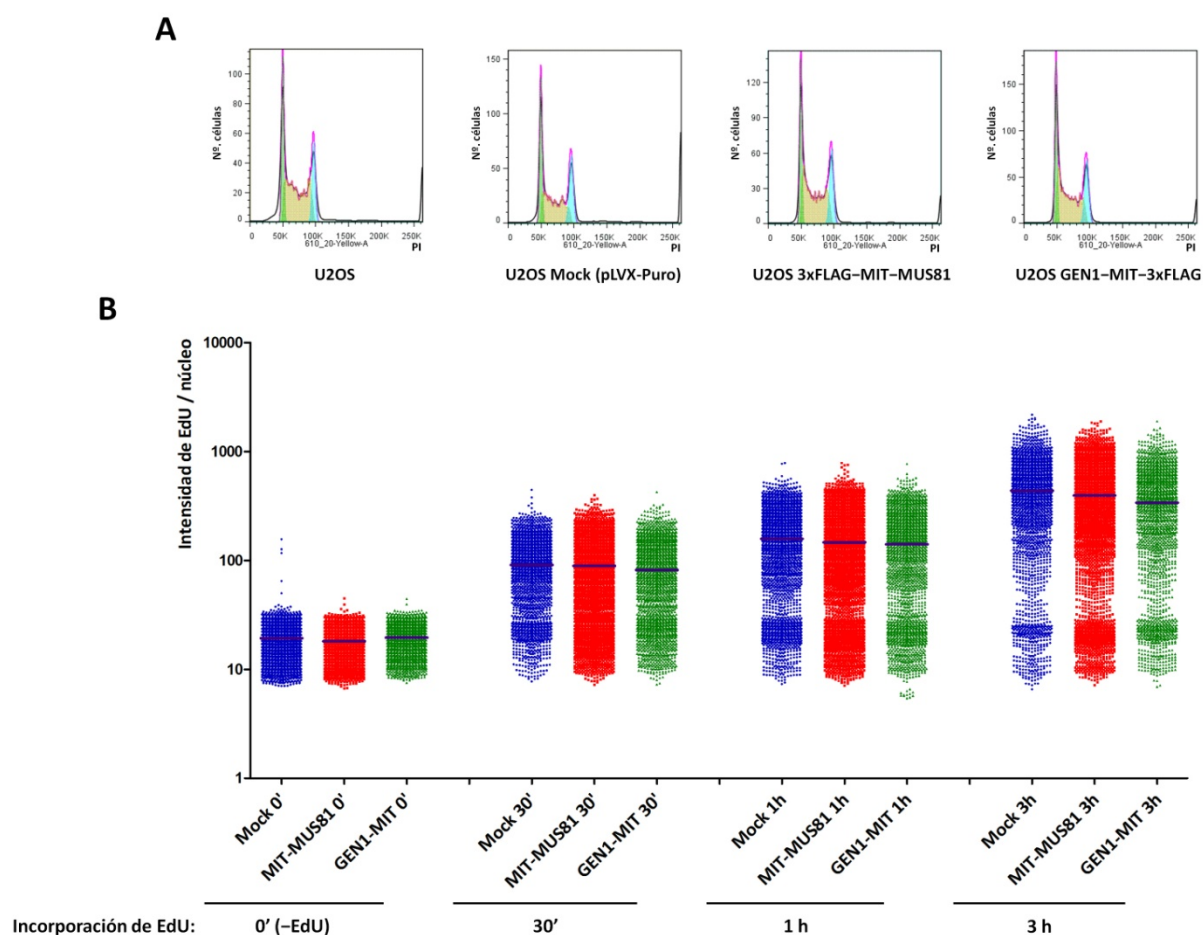
Una vez comprobado el efecto en la mDDR de la eliminación de las endonucleasas de resolución mitóticas, el siguiente paso lógico sería el estudio de las consecuencias de su sobreactivación. Con este propósito, de las posibles estrategias de sobreactivación de las endonucleasas de resolución mitóticas, y dado que su actividad está sujeta a una fina regulación, se consideró como la más eficaz la de incrementar su concentración local en el *midbody*, lo que podría posibilitar una mayor actividad localizada en la zona de reparación y que, por tanto, ésta resultara más eficaz. Para ello, se decidió fusionar a las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 humanas el dominio MIT (dominio de interacción y tráfico de microtúbulos, *microtubule-interacting and -trafficking domain*) de la Spastina (residuos 116-194 de la proteína humana), mediante el cual ésta interacciona con la subunidad CHMP1B del complejo ESCRT-III localizado en el *midbody*, lo que la dirige a éste, donde ejerce su actividad cortadora de microtúbulos para propiciar la abscisión citocinética (Yang D. *et al.*, 2008) (Figura 72A). Para posibilitar la detección inmunológica de las proteínas de fusión, se les incorporó además la etiqueta 3xFLAG. Así pues, las proteínas quiméricas generadas fueron 3xFLAG-MIT-MUS81 y GEN1-MIT-3xFLAG.

Las construcciones génicas se subclonaron en vectores de expresión lentiviral (pLVX-Puro) y retroviral (pBABE-puro), con los que se infectaron células U2OS a fin de obtener las líneas de expresión estable U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, así como la línea control U2OS Mock (infectada con el vector vacío). Se obtuvieron tres conjuntos de las tres líneas, mediante infección lentiviral, infección retroviral usando el plásmido de envuelta anfotrópica pCL-Ampho e infección retroviral usando el plásmido de envuelta politrópica pVSV-G, respectivamente. Se verificó la expresión de las proteínas de fusión mediante *Western blot* con anticuerpo anti-FLAG, tratando de detectar las bandas predichas (3xFLAG-MIT-MUS81, 73.04 KDa; GEN1-MIT-3xFLAG, 112.31 KDa), encontrándose que sólo las líneas generadas por infección lentiviral mostraron una expresión óptima de ambas proteínas, por lo que fueron las células usadas en lo sucesivo (Figura 72B). Del mismo modo, se verificó la localización de las proteínas de fusión en el *midbody* mediante inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-FLAG y detectando también Aurora B como marcador de *midbodies*, siguiendo el protocolo usado para la detección de 53RBs (Figura 72C).

Considerando que con las líneas U2OS Mock (pLVX-Puro), U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG se realizarán experimentos relacionados con citocinesis y progresión en ciclo celular, se verificó en ellas el correcto estado de ésta. Mediante tinción con PI y análisis FACS, se comprobó que el perfil de ciclo celular es equivalente entre las tres líneas y con células U2OS normales (Figura 73A). Usando etiquetado con EdU, se analizó por microscopía de alto rendimiento (HTM) la incorporación de éste a diferentes tiempos, obteniéndose que la proliferación celular es normal y equivalente en las tres líneas celulares (Figura 73B).



**Figura 72 | Concentración artificial de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*.** (A) Estrategia para la concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 en el *midbody*. La fusión a ellas del dominio MIT de la Spastina, a través del cual interacciona con la subunidad CHMP1B del complejo ESCRT-III del *midbody*, las direccionaría hacia éste. Se generaron las proteínas quiméricas 3xFLAG-MIT-MUS81 y GEN1-MIT-3xFLAG, permitiendo el epítipo 3xFLAG su detección inmunológica. (B) Verificación de la expresión de las proteínas quiméricas 3xFLAG-MIT-MUS81 (73.04 KDa) y GEN1-MIT-3xFLAG (112.31 KDa) en las líneas celulares estables generadas, por *Western blot* con anticuerpo anti-FLAG. LV pLVX-Puro-, líneas generadas por infección lentiviral con este vector; RV Amphi pBABE-puro-, líneas generadas por infección retroviral con este vector usando el plásmido de envuelta anfotrópica pCL-Amphi; RV VSV-G pBABE-puro-, líneas generadas por infección retroviral con este vector usando el plásmido de envuelta politrópica VSV-G; M, línea U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81; G, línea U2OS GEN1-MIT-3xFLAG; U2OS, control no infectado. Sólo en las líneas generadas mediante infección lentiviral la expresión resultó óptima, estando presentes las bandas predichas para las dos proteínas de fusión. En los otros dos grupos de líneas, GEN1-MIT-3xFLAG estuvo prácticamente ausente y 3xFLAG-MIT-MUS81 se expresó a niveles menores. Se emplearon la  $\alpha$ -Tubulina (49.5 KDa) y la tinción de la membrana con rojo *Ponceau* como controles de carga. (C) Verificación de la localización en el *midbody* de las proteínas quiméricas 3xFLAG-MIT-MUS81 y GEN1-MIT-3xFLAG mediante inmunofluorescencia con el protocolo de detección de 53RBs, usando el anticuerpo anti-FLAG (verde), tinción de AURKB (rojo) como marcador de *midbodies* y DAPI para la detección de los núcleos (azul). En la línea control, U2OS Mock (pLVX-Puro), infectada con el vector vacío, la señal 3xFLAG resultó inexistente. En la línea U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81, la señal 3xFLAG (indicada por flechas) se detectó en el *midbody*, presentando también los acúmulos nucleares característicos de la inmunofluorescencia de MUS81 (Figura 44). En la línea GEN1-MIT-3xFLAG, la señal 3xFLAG (indicada por flechas) apareció especialmente concentrada en el *midbody*, presentando también la localización citosólica obtenida en la inmunofluorescencia de GEN1 (Figura 44).



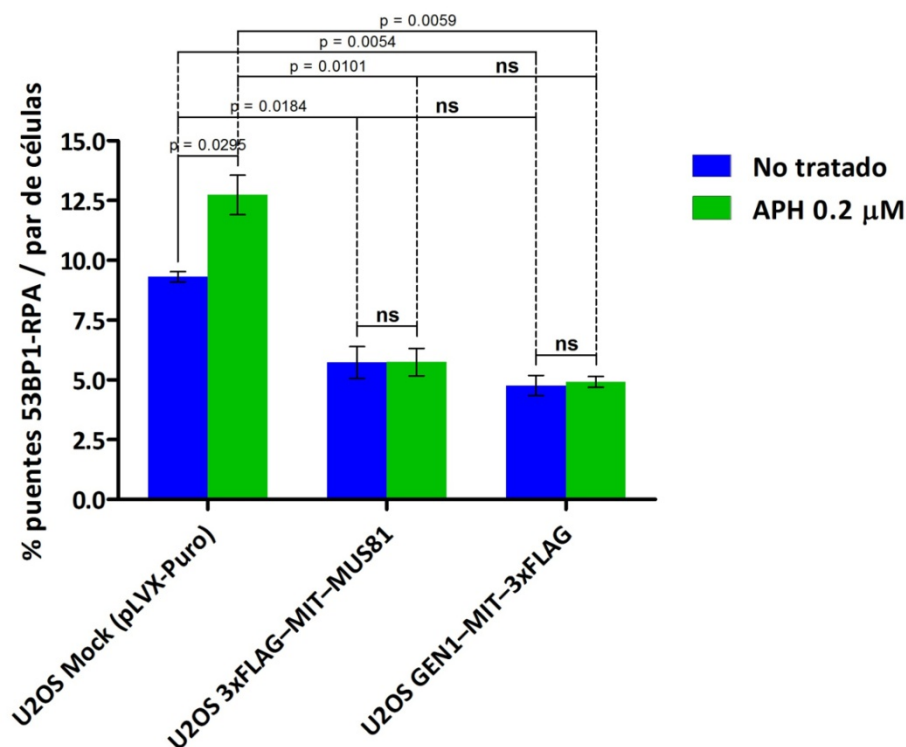
**Figura 73 | Verificación de ciclo celular y proliferación normales en las líneas celulares con concentración de MUS81 y GEN1 en el *midbody*.** (A) Perfiles de ciclo celular obtenidos por tinción con PI y análisis FACS. U2OS, células no infectadas; U2OS Mock (pLVX-Puro), línea control infectada con el vector vacío; U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81, línea expresando esta proteína quimérica; U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, línea expresando esta proteína quimérica. Los perfiles resultaron normales y equivalentes en todas las líneas. (B) Análisis de proliferación celular por incorporación de EdU a distintos tiempos (sin EdU, 30 min, 1 h y 3 h). Tinción inmunofluorescente de EdU y análisis por microscopía de alto rendimiento (HTM). Se representan intensidades de señal de EdU por núcleo, viniendo dado cada uno por un punto. Las medias se indican con líneas azul oscuro. Mock, línea control U2OS Mock (pLVX-Puro); MIT-MUS81, línea U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81; GEN1-MIT, línea U2OS GEN1-MIT-3xFLAG. La proliferación resultó normal y equivalente en las tres líneas.

#### 5.4. La concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* disminuye la activación de la mDDR

Seguidamente, se analizó el efecto de la concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 en el *midbody* sobre la activación de la mDDR, usando los 53RBs como marcador de ésta. Se efectuaron tinciones inmunofluorescentes de 53RBs en las líneas celulares U2OS Mock (pLVX-Puro) (control), U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, introduciéndose además tratamientos de estrés replicativo leve con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante 24 h, a fin de comparar el efecto de éste sobre las condiciones normales sin tratamiento. La formación de 53RBs se cuantificó como porcentaje de 53RBs por par de células (Figura 74). En condiciones



normales, sin tratamiento, la formación de 53RBs se vio notablemente disminuida en las líneas U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 ( $\approx 5.5\%$  de 53RBs) y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG ( $\approx 5\%$ ) con respecto a la línea control ( $\approx 9.5\%$ ). La reducción resultó similar en ambas líneas, sin diferencias significativas entre ellas. En condiciones de estrés replicativo leve (con APH), los resultados fueron análogos, con la particularidad de que el efecto inductor de éste sobre la formación de 53RBs, percibido en la línea control ( $\approx 12.5\%$ ), no se manifestó en las líneas U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, donde la formación de 53RBs resultó prácticamente idéntica a sin tratamiento.



**Figura 74 | Disminución de la activación de la mDDR con la concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*.** Cuantificación de la formación de 53RBs como medida de la activación de la mDDR en células control (línea U2OS Mock (pLVX-Puro)) y células con concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 en el *midbody* (líneas U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, respectivamente). Se introdujeron tratamientos con afidicolina (APH) 0.2  $\mu$ M durante 24 h para inducir estrés replicativo leve. La formación de 53RBs se cuantificó a partir de tinciones inmunofluorescentes de éstos como porcentajes de 53RBs por par de células, contabilizándose 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. En las líneas con concentración de las endonucleasas en el *midbody* se apreció una notable disminución en la formación de 53RBs y, por tanto, en la activación de la mDDR, respecto a la línea control. En ellas, además, no se apreció el efecto inductor de la activación de la mDDR causado por el estrés replicativo leve.

Estos resultados permitieron concluir que la concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas, MUS81 o GEN1, en el *midbody* disminuye la activación de la mDDR. Al concentrarse su actividad en la zona del puente cromosómico, éste sería resuelto de modo más eficaz, con mayor rapidez, con lo que la mDDR dejaría antes de estar activa y se observarían menos 53RBs. El resultado



es el opuesto al obtenido en el caso contrario, con la depleción de las endonucleasas de resolución mitóticas, y está acorde con las predicciones de nuestro modelo hipotético. Por otra parte, la pérdida del efecto inductor en la formación de 53RBs del estrés replicativo leve en las líneas U2OS 3xFLAG–MIT–MUS81 y U2OS GEN1–MIT–3xFLAG indicaría que estas líneas celulares podrían estar protegidas frente a estrés replicativo.

## 5.5. La concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* rescata la citocinesis sin activación de la mDDR

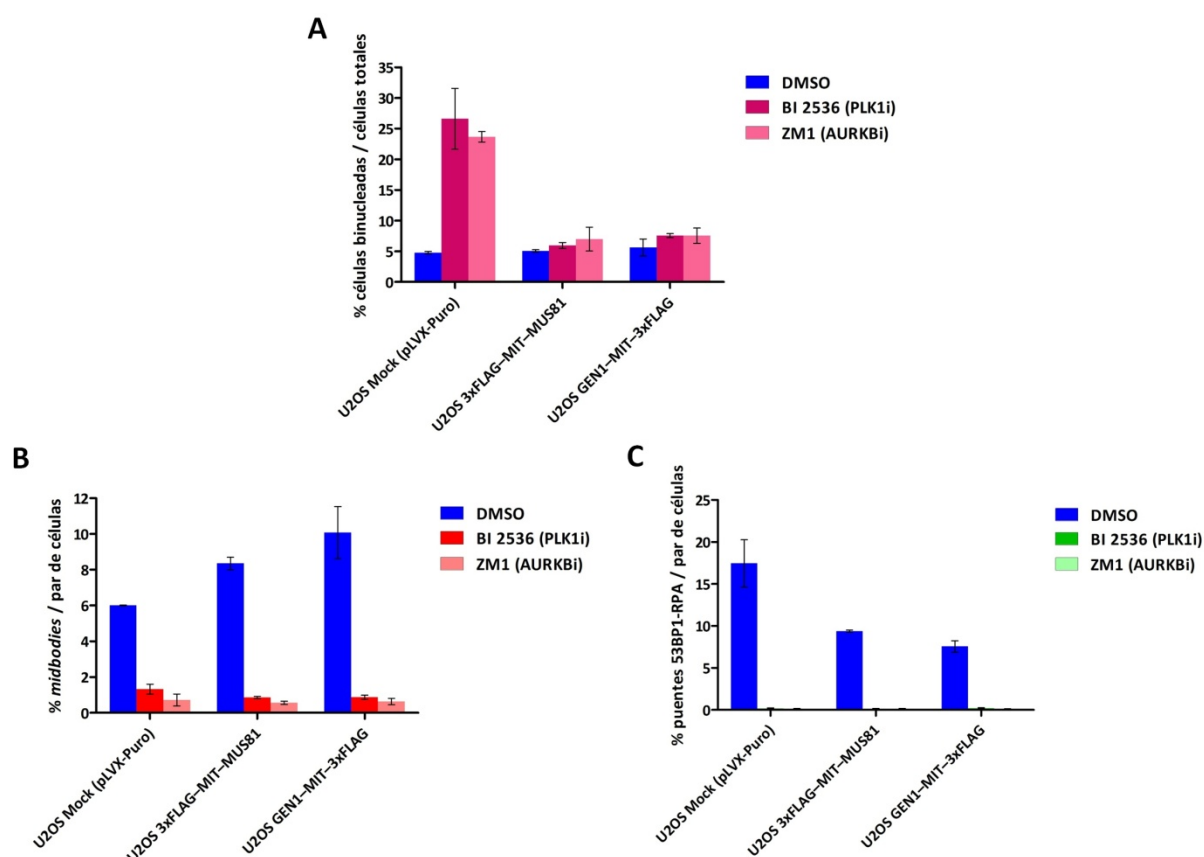
Como hemos visto en el apartado 4.2, la mDDR depende de Aurora B y PLK1. Las inhibiciones de estas kinasas en células U2OS normales causaban la supresión del ensamblaje del *midbody* y de la formación de 53RBs, a la par que incrementaban concomitantemente la binucleación. Es decir, desactivaban la mDDR y, en consecuencia, daban lugar a una citocinesis defectuosa. Para estudiar la contribución a estos fenómenos de las endonucleasas de resolución mitóticas, se llevaron a cabo experimentos análogos con las líneas celulares con concentración de éstas (MUS81 y GEN1) en el *midbody*, U2OS 3xFLAG–MIT–MUS81 y U2OS GEN1–MIT–3xFLAG, junto a su línea control U2OS Mock (pLVX-Puro). Se aplicaron inhibiciones de Aurora B y PLK1 específicamente en anafase por tratamiento con ZM1 2  $\mu$ M y BI 2536 100 nM, respectivamente, manteniéndose durante 10 h hasta la siguiente fase G1, donde se analizaron los parámetros relacionados con la citocinesis y la mDDR: Binucleación, ensamblaje del *midbody* y formación de 53RBs. Comparando la línea control con las de concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*, se obtuvieron los siguientes resultados:

- La binucleación se analizó a partir de inmunofluorescencia de Aurora B (*midbodies*) y  $\alpha$ -Tubulina (citoplasmas), reconociendo los núcleos por su tinción con DAPI, habiendo aplicado previamente sincronización celular por *shake-off* mitótico con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como porcentaje de células binucleadas respecto del total de células (Figura 75A). Mientras que en la línea control las inhibiciones de PLK1 o Aurora B indujeron un dramático incremento de binucleación con respecto al tratamiento control (DMSO), en las líneas con concentración de MUS81 y GEN1 en el *midbody* este incremento no se produjo, siendo la cantidad de células binucleadas obtenida con las inhibiciones de PLK1 o Aurora B comparable a la existente en el tratamiento control. El efecto resultó prácticamente idéntico para las dos líneas. Así pues, éstas fueron capaces de rescatar la citocinesis con inhibición de PLK1 o Aurora B.
- El ensamblaje del *midbody* se analizó a partir de la misma inmunofluorescencia anterior, habiendo aplicado previamente sincronización celular por *shake-off* mitótico con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como porcentaje de *midbodies* por par de células (Figura 75B). En la línea control, la inhibición tanto de PLK1 como de Aurora B

disminuyó drásticamente el ensamblaje del *midbody* con respecto al tratamiento control con DMSO. Las líneas con concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* presentaron el mismo efecto. Esto es coherente con el hecho de que la inhibición de PLK1 o de Aurora B no activa la mDDR en ningún caso, por lo que ni siquiera se detectan *midbodies* con Aurora B (aunque sí que contendrían el resto de proteínas implicadas en citocinesis). Un efecto curioso de la concentración en el *midbody* de endonucleasas de resolución mitóticas fue que, en el tratamiento control sin inhibición de PLK1 o de Aurora B, la frecuencia de ensamblaje del *midbody* resultó significativamente mayor en comparación con el tratamiento control de la línea control, lo que podría deberse a que, al repararse más eficientemente los puentes cromosómicos, la citocinesis se induce con mayor facilidad, formándose más *midbodies* tempranos, no persistentes, sin activación de la mDDR asociada.

- La formación de 53RBs se analizó a partir de inmunofluorescencia de éstos para 53BP1 y RPA, habiendo aplicado previamente sincronización celular con inhibiciones anafásicas. Su frecuencia se cuantificó como porcentaje de 53RBs por par de células (Figura 75C). Tanto en la línea control como en las de concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*, la inhibición de PLK1 o Aurora B redujo de forma total la formación de 53RBs con respecto al control no tratado, lo cual está acorde con la inactivación de la mDDR causada por estas inhibiciones. En los tratamientos control con DMSO, se observó el efecto de reducción notable en la formación de 53RBs en las líneas con concentración de endonucleasas en el *midbody* (equivalente en ambas) comparadas con la línea control, indicativo de la disminución de la activación de la mDDR como resultado de la mayor eficiencia en la resolución de los puentes cromosómicos.

En conclusión, la concentración de endonucleasas de resolución mitóticas, MUS81 o GEN1, en el *midbody*, en condiciones de inhibición de Aurora B o PLK1, causó un rescate de la citocinesis sin activación de la mDDR ni formación de *midbodies* de Aurora B. Esto se explicaría considerando que, aunque Aurora B o PLK1 estén inhibidas y no se active la mDDR, las proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG son reclutadas al *midbody* por una vía paralela independiente de la presencia de Aurora B en él y de la activación de la mDDR, basada en el reconocimiento del complejo ESCRT-III y de los microtúbulos del *midbody* a través del dominio MIT fusionado, por lo que su actividad de resolución de puentes cromosómicos se llevará a cabo de forma independiente a la inhibición de Aurora B o PLK1. Al resolverse éstos, la abscisión citocinética puede producirse sin problemas y no se genera binucleación. En definitiva, se *bypassea* la vía de citocinesis dependiente de mDDR y ésta se lleva a cabo correctamente aun con Aurora B o PLK1 inhibidas.



**Figura 75 | Rescate de la citocinesis sin activación de la mDDR con la concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*.** Inhibición específica en anafase de PLK1 (con BI 2536 100 nM, PLK1i) y AURKB (con ZM1 2  $\mu$ M, AURKBi) en células U2OS control (línea U2OS Mock (pLVX-Puro)) y con concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 en el *midbody* (líneas U2OS 3xFLAG-MIT-MUS81 y U2OS GEN1-MIT-3xFLAG, respectivamente). DMSO, control de solvente. Los tratamientos se mantuvieron durante 10 h, hasta la siguiente fase G1, donde las células se fijaron y se efectuaron tinciones inmunofluorescentes de 53RBs (53BP1 y RPA) y de *midbodies* (AURKB y  $\alpha$ -Tubulina) marcando los núcleos con DAPI. Se analizaron 350-500 células en cada una de 3 réplicas independientes. **(A)** Cuantificación de la binucleación. Frecuencias en porcentajes de células binucleadas respecto del total de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB la aumentaron dramáticamente únicamente en la línea control, pero no en las líneas con concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*, en las que adoptó valores similares a los del control no tratado. **(B)** Cuantificación del ensamblaje del *midbody*. Frecuencias en porcentajes de *midbodies* por par de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB lo suprimieron drásticamente en las tres líneas celulares. **(C)** Cuantificación de la formación de 53RBs. Frecuencias en porcentajes de 53RBs por par de células. Las inhibiciones de PLK1 y AURKB la redujeron de forma prácticamente total en las tres líneas celulares, indicativo de ausencia de activación de la mDDR. En ausencia de las inhibiciones, se observó el descenso en la formación de 53RBs causado por las líneas con concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* respecto de la línea control.





## DISCUSIÓN



# DISCUSIÓN

## A) Mecanismo de reclutamiento de 53BP1 a las roturas de doble cadena del ADN

La presente tesis doctoral comenzó centrada en la proteína 53BP1, un conocido mediador/adaptador de la DDR a DSBs capaz de unirse a éstas, pasando de una localización pan-nuclear a formar focos nucleares discretos. La cuestión a la que se perseguía dar respuesta no era otra sino la elucidación del mecanismo por el cual 53BP1 es reclutada a las DSBs, ya que el único modelo existente al respecto era meramente especulativo y no comprobado experimentalmente. Por ello, se partió de la exploración de las bases de dicho “modelo clásico”, encontrándose fuertes inconsistencias que en cierto modo lo ponían en entredicho. En base a éstas, formulamos “nuestro modelo” para el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs, según el cual asignamos una función mejor definida al dominio Tudor en tándem de la proteína, en torno al cual giran los modelos propuestos de unión de 53BP1 a las DSBs. Por ello, la parte experimental del proyecto presenta la particularidad de estar basada en un modelo que expusimos previamente, siendo su verificación uno de nuestros objetivos.

Para la verificación de nuestro modelo, usamos una estrategia de recuperación funcional de dominios que nos llevó a demostrar la existencia de una categoría funcional de éstos cuya misión sería la unión genérica e inespecífica a cromatina, por lo que serían intercambiables con el dominio Tudor en la proteína 53BP1. En esta línea, analizamos el papel de distintos dominios de unión a cromatina en la DDR, proceso en el que desempeñarían una función genérica consistente en propiciar la localización cromatínica de las proteínas que los portan. La importancia de estos dominios de unión genérica a cromatina se puso de manifiesto mediante análisis bioinformático, mostrándose su aparición recurrente en las proteínas de la DDR. Por otra parte, tratamos de extender nuestro modelo a otra proteína de la DDR con otro dominio de unión a cromatina: MSH6, proteína del MMR, y su dominio PWWP. Esto nos llevó a demostrar el vínculo existente entre la función de ésta y su unión a la cromatina.

Finalmente, tratando de refinar nuestro modelo de formación de focos de 53BP1, tratamos de hallar en ésta, de nuevo mediante predicciones bioinformáticas, nuevos elementos que pudieran contribuir a tal proceso. Obtuvimos que 53BP1 presenta capacidad de unión directa al ADN *in vitro*, e



intentamos localizar ciertas regiones candidato mediante las que tendría lugar esta interacción. Sin embargo, el análisis de distintas proteínas mutantes reveló que este proceso podría ser más complicado de lo previsto, estando gobernado posiblemente por complejas interacciones que implican al propio dominio Tudor.

En los siguientes apartados, se discutirán todas estas cuestiones poniendo especial énfasis en los resultados obtenidos y en su comparación con otros trabajos realizados, subrayando además otras opciones para un posible abordaje experimental futuro.

## **1. Mecanismo molecular del reclutamiento de 53BP1 a las DSBs**

### **1.1. Inconsistencias del *modelo clásico* de formación de focos de 53BP1**

La presencia en la proteína 53BP1 de un dominio Tudor en tándem, de unión a la marca de histonas H4K20me<sub>2</sub>, vincula directamente su función con la cromatina. Sin embargo, el reclutamiento focal de 53BP1 a las DSBs ha de ser compatible con la distribución genómica de H4K20me<sub>2</sub> de forma constitutiva, aun en ausencia de daño en el ADN (Pesavento *et al.*, 2008; Schotta *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Asumiendo esta premisa, el “modelo clásico” de formación de focos de 53BP1, propuesto por Thanos Halazonetis (Huyen *et al.*, 2004), Tony Kouzarides (Sanders *et al.*, 2004) y Junjie Chen (Botuyan *et al.*, 2006), asume que H4K20me<sub>2</sub> no puede ser reconocida por el dominio Tudor de 53BP1 en ausencia de daño en el ADN debido a que permanece “enterrada” en la estructura del nucleosoma, inaccesible a tal interacción. En presencia de DSBs, la marca quedaría expuesta para este reconocimiento, llevado a cabo por unión directa a las DSBs a través del dominio Tudor, lo que permite el reclutamiento focal de 53BP1 (Figura 76A).

La primera duda que plantea este modelo viene dada por la supuesta “oclusión” de la marca H4K20me<sub>2</sub> en la estructura del nucleosoma, ya que es un hecho no demostrado experimentalmente. Además, contradice el principio bien demostrado de que las colas N-terminales de las histonas, junto con sus modificaciones epigenéticas, permanecen expuestas sobresaliendo de la estructura globular del nucleosoma, motivo por el cual tales modificaciones postraduccionales, sin excepción, son reconocidas por los dominios específicos de las proteínas efectoras pertinentes. Más aún, posteriormente se identificaron proteínas no relacionadas con la DDR que reconocen la marca H4K20me<sub>2</sub> independientemente de la presencia de daño en el ADN y que no son reclutadas a las DSBs. Es el caso del compactador de cromatina L3MBTL1 (similar a (3)tumor cerebral maligno 1, *lethal(3)malignant brain tumor-like 1*) con sus dominios MBT (Trojer *et al.*, 2007) y del regulador epigenético Pdp1 (proteína conteniendo dominio PWWP 1, *PWWP domain-containing protein 1*) de *Schizosaccharomyces pombe* a través de su dominio PWWP (Wang *et al.*, 2009).

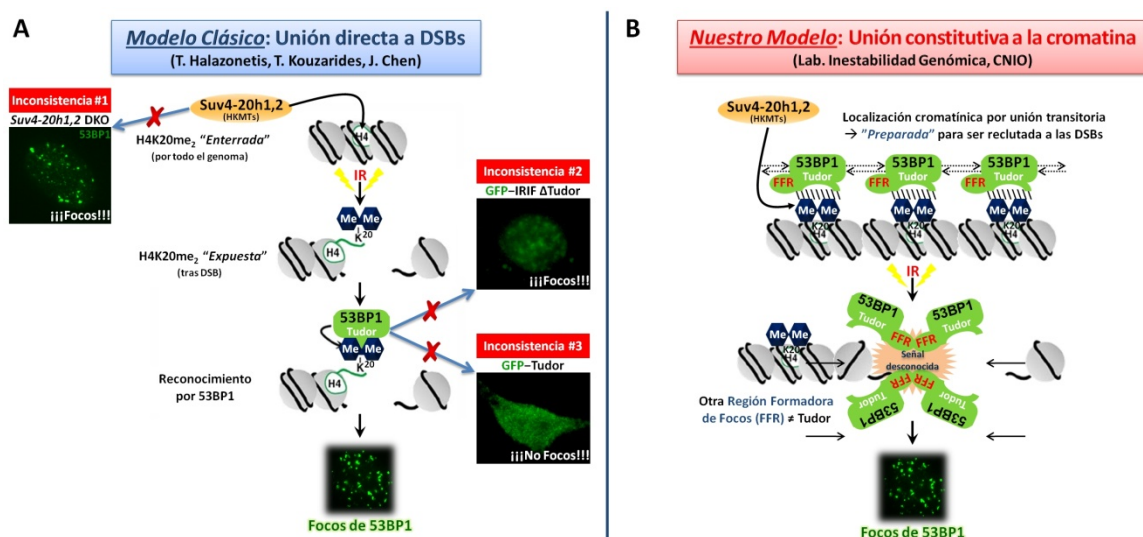
Otra inconsistencia previa del “modelo clásico” surgió con su propia formulación, afectando a la naturaleza de la marca epigenética reconocida por el dominio Tudor en tándem de 53BP1 en mamíferos. En principio, Thanos Halazonetis asignó que ésta era H3K79me y que la depleción de DOT1L (hDot1L, KMT4) (similar al disruptor de la elongación telomérica 1, *disruptor of telomere silencing 1-like*), la histona metiltransferasa que la cataliza, en células U2OS reduce la formación de focos de 53BP1 (Huyen *et al.*, 2004). Sin embargo, poco después Junjie Chen demostró en células HeLa que el silenciamiento de DOT1L no afecta a la formación de focos de 53BP1 (Botuyan *et al.*, 2006), lo cual ha sido corroborado posteriormente en otras líneas celulares (FitzGerald *et al.*, 2011). Junjie Chen también aseguró que el *knock-down* de SET8, la enzima que cataliza H4K20me<sub>1</sub>, el sustrato para la dimetilación por Suv4-20h1,2, elimina los focos de 53BP1, estableciendo H4K20me<sub>2</sub> como la marca reconocida por el dominio Tudor de 53BP1 (Botuyan *et al.*, 2006). No obstante, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la depleción de SET8 no elimina los focos de 53BP1, sino que los hace ineficientes.

En nuestra revisión del “modelo clásico” de formación de focos de 53BP1, detectamos experimentalmente una serie de nuevas inconsistencias que lo ponen en entredicho (Figura 76A). La primera de ellas es el hecho de que la eliminación de la marca H4K20me<sub>2</sub> mediante el doble KO de las dos histona lisina-metiltransferasas (HKMTs) responsables de catalizarla, Suv4-20h1 (SUV420H1, KMT5B) y Suv4-20h2 (SUV420H2, KMT5C), aún permite la formación de focos de 53BP1, aunque sean ineficientes a tiempos cortos. Relacionado con esto, también hallamos que 53BP1 se encuentra localizada en la cromatina de forma constitutiva, aun en ausencia de daño en el ADN, localización que se pierde en las células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>. Contradiciendo también el “modelo clásico”, obtuvimos que el dominio Tudor en tándem de 53BP1, por sí solo, no forma focos inducidos por radiación ionizante. Sin embargo, la eliminación de este dominio de la proteína sigue permitiendo la formación de focos, aunque de forma ineficiente. Por último, y como complemento de los anteriores datos, obtuvimos que existen diferentes dinámicas de 53BP1 en la cromatina no asociada a sus focos en las DSBs con respecto a éstos, lo que revela que ambas uniones son procesos independientes y que la primera se relaciona con H4K20me<sub>2</sub> (diferente entre células wt y sin H4K20me<sub>2</sub>) mientras que la segunda no (igual en células wt y sin H4K20me<sub>2</sub>).

## 1.2. Nuestro modelo de formación de focos de 53BP1

Con estos resultados, proponemos un nuevo modelo de formación de focos de 53BP1 según el cual ésta se mantendría constitutivamente unida a la cromatina mediante el reconocimiento de la marca H4K20me<sub>2</sub> por su dominio Tudor en tándem. Esta unión sería independiente de la presencia de daño en el ADN, se llevaría a cabo por interacciones de naturaleza más bien débil y transitoria, pero continuas, y mantendría a la proteína en la cromatina en un estado “preparado” para actuar de forma rápida y eficiente una vez tuviera lugar la lesión. Cuando esto ocurre, la proteína se reclutaría a las

DSBs reconociendo otra señal diferente a H4K20me<sub>2</sub> a través de otra región formadora de focos (FRR, *foci-forming region*) diferente al dominio Tudor (Figura 76B). En definitiva, la función del dominio Tudor en tándem de 53BP1 no es otra que propiciar la unión constitutiva de la proteína a la cromatina para asegurar que su función se lleva a cabo en ésta de forma eficiente.



**Figura 76 | Comparación del "modelo clásico" con "nuestro modelo" de formación de focos de 53BP1.** (A) "Modelo clásico" de formación de focos de 53BP1, basado en la unión directa de la proteína a la marca H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs a través de su dominio Tudor en tándem. Se muestran las principales inconsistencias detectadas experimentalmente: **#1**, En las células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>, la formación de focos de 53BP1 sigue siendo posible, aunque ineficiente. **#2**, La eliminación del dominio Tudor tampoco elimina la formación de focos, que se sigue dando aunque de forma ineficiente. **#3**, El dominio Tudor por sí solo no forma focos. (B) "Nuestro modelo" de formación de focos de 53BP1. Tratando de explicar las inconsistencias anteriores y teniendo en cuenta que 53BP1 está unida a la cromatina de forma constitutiva incluso en ausencia de daño en el ADN a través de la interacción Tudor-H4K20me<sub>2</sub>, proponemos que esta unión mantendría a la proteína "preparada" para actuar cuando tuvieran lugar las DSBs, a las que se uniría a través de otras interacciones diferentes.

Nuestro modelo se vio verificado mediante la estrategia de recuperación funcional de dominios. Por una parte, demostramos que el dominio Tudor no es esencial para la formación de focos de 53BP1, que es posible sin él, aunque de manera ineficiente, sino más bien para su localización cromatínica constitutiva. Por otra parte, la función de Tudor puede ser sustituida por otros dominios de unión genérica a cromatina procedentes de proteínas no relacionadas con la DDR, los cuales serían funcionalmente equivalentes. Esto se comprobó con dominios de unión a H4K20me<sub>2</sub>, como es el caso de PWWP de la ADN metiltransferasa *de novo* DNMT3B1 y de 3xMBT-ZnF del compactador de cromatina L3MBTL1, así como, en menor medida, con un dominio de unión inespecífica al ADN internucleosómico, H15 de la histona *linker* H1.2. La complementación funcional con estos dominios fue capaz de recuperar la localización cromatínica y la afinidad por la cromatina propiciadas por el dominio Tudor en tándem, así como la formación eficiente de focos de 53BP1, esta última al menos de forma parcial.

Existen ciertos trabajos que apoyan nuestro modelo y describen resultados similares. El primero de ellos es el que describe la generación y el fenotipo del ratón *Suv4-20h1,2* DKO, con niveles prácticamente indetectables de H4K20me<sub>2</sub>, el cual sufre serios problemas de inestabilidad genómica, con formación ineficiente de focos de 53BP1 a tiempos tempranos del mismo modo que la analizada en nuestro caso (Schotta *et al.*, 2008). Paralelamente, otros autores, en un análisis de la dimetilación de H4K20 por la enzima Suv4-20 en *Drosophila*, muestran que en células HeLa la depleción de Suv4-20h1,2 empeora la formación de focos de 53BP1, aunque éstos siguen siendo posibles (Yang *et al.*, 2008). Por otra parte, la localización constitutiva de 53BP1 en la cromatina se ha puesto de manifiesto en el estudio sobre la generación y el fenotipo del ratón *RNF8* KO (Santos *et al.*, 2010). En él se muestra que la unión constitutiva de 53BP1 a la cromatina es independiente de RNF8, ya que se sigue produciendo en ausencia de ésta, no así la formación de focos, no posible sin RNF8, ni el CSR, con serios defectos en ausencia de ésta. Se concluye que, por tanto, la asociación de 53BP1 con la cromatina tiene lugar en dos pasos, el primero de ellos, su unión constitutiva, dependiente de H4K20me<sub>2</sub>, y el segundo, la formación de focos ante DSBs en el ADN, dependiente de las ubiquitinaciones desencadenadas por la ruta de RNF8. Los resultados aportados por esta primera parte de la presente tesis doctoral contribuyeron a esclarecer estos conceptos, motivo de la participación en dicha publicación (adjunta en el Anexo II).

### 1.3. Implicaciones de nuestro modelo

El nuevo modelo propuesto para la formación de focos de 53BP1 posee el añadido de contar con una serie de implicaciones que lo hacen atractivo en el campo de la Biología Molecular a nivel básico:

- 1) Se trata de un novedoso modelo de unión de proteínas a la cromatina en la DDR, extensible también a otros procesos.
- 2) Incorpora el concepto de *dominio de unión genérica a cromatina*, entendida ésta como una unión inespecífica.
- 3) Asigna un papel claro a la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>. La función de esta marca ubicua ha resultado siempre ciertamente confusa, estando en gran parte indefinida. Se sabía que H4K20me<sub>1</sub> interviene en regulación del ciclo celular mediada por la histona lisina-metiltransferasa SET8 (SETD8, PR-Set7, SET07, KMT5A) (Jørgensen *et al.*, 2007; Huen *et al.*, 2008), y que H4K20me<sub>3</sub> está asociada a heterocromatina constitutiva y procesos de represión transcripcional (Fodor *et al.*, 2006; Balakrishnan y Milavetz, 2010). Ahora, podemos asignar a H4K20me<sub>2</sub> una función de direccionamiento inespecífico de proteínas a la cromatina.
- 4) Explicaría el mecanismo molecular de ciertas patologías, incluyendo algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, en el caso del síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad

centromérica y anomalías faciales), debido a la mutación puntual S282P en el dominio PWWP de la ADN metiltransferasa *de novo* DNMT3B.

- 5) Posee potencial biotecnológico, en concreto para el direccionamiento de proteínas a la cromatina de forma inespecífica.
- 6) Implica equivalencia funcional entre dominios de unión genérica a cromatina. Por ejemplo, entre los miembros de la familia Royal (Tudor, PWWP, MBT, etc.).

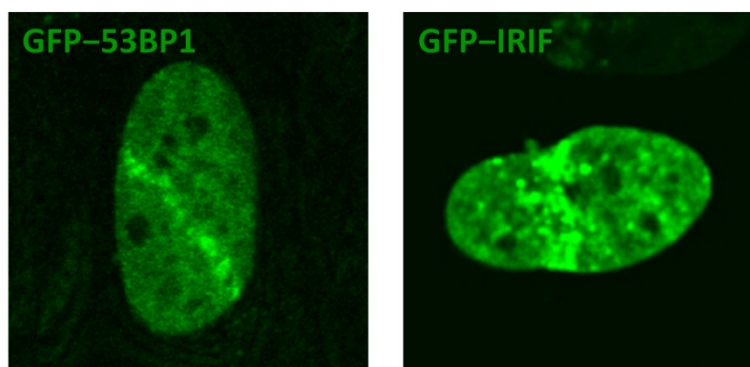
#### 1.4. Debilidades de nuestro modelo

Nuestro modelo de formación de focos de 53BP1 no está exento de debilidades y presenta ciertos aspectos aún por concretar:

- Presupone la existencia de una nueva región formadora de focos (FFR, *foci-forming region*) en 53BP1 diferente del dominio Tudor. No obstante, este estudio se abordó más adelante, e incluso, recientemente, otro grupo ha logrado identificarla.
- Del mismo modo, implica también la existencia de una nueva señal desconocida para el reclutamiento de 53BP1 a las DSBs. Al igual que en el caso anterior, tratamos de indagar sobre esta cuestión, que en la actualidad parece haber sido resuelta por otro laboratorio.
- No se ha demostrado la supuesta naturaleza transitoria de las uniones Tudor–H4K20me<sub>2</sub>, necesaria para propiciar el reclutamiento final a las DSBs mediante otra unión de mayor afinidad. Esta cuestión podría abordarse mediante estudios *in vitro* sobre la afinidad de esta interacción, por ejemplo mediante resonancia de plasmón superficial (SPR, *surface plasmon resonance*) con un sistema Biacore®. No obstante, el microambiente *in vivo* subyacente a esta interacción en el contexto de la cromatina sería muy difícil de reproducir, existiendo muchos factores y variables implicados.
- La recuperación de la formación de focos de 53BP1 obtenida mediante nuestra estrategia de recuperación funcional de dominios resultó ser sólo parcial. Se obtuvieron mejores resultados con los dominios PWWP y 3xMBT–ZnF (proteínas quiméricas GFP–IRIF\*–PWWP y GFP–IRIF\*–3xMBT–ZnF), implicados en la unión a metilaciones de H4K20, mientras que la recuperación de la formación de focos fue incluso menor con el dominio H15 (proteína GFP–IRIF\*–H15), no relacionado con el reconocimiento de metilaciones de histonas. Con el resto de dominios de unión inespecífica a cromatina, la recuperación fue o muy baja o prácticamente inexistente, prácticamente sin diferencias con la eliminación del dominio Tudor (proteínas GFP–IRIF\* y GFP–IRIF ΔTudor).

- Como consecuencia de lo anterior, es posible que nuestro modelo se restrinja únicamente a dominios de unión a histonas metiladas, o, más concretamente, a metilaciones de H4K20 e incluso, de modo más restrictivo, a dominios con afinidad por H4K20me<sub>2</sub>. El concepto de *unión genérica a cromatina* podría quedar restringido únicamente a tales dominios y esta marca de histonas, al menos en el caso de la formación de focos de 53BP1.
- Como complemento a los ensayos de formación de focos inducidos por radiación ionizante, también se realizaron algunos ensayos de reclutamiento láser con las proteínas quiméricas obtenidas. Estos experimentos fueron llevados a cabo por el grupo de nuestro colaborador Jiri Lukas (*Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research*, Copenhague, Dinamarca). Sin embargo, y de forma más o menos consistente con el rescate parcial de la formación de focos, las proteínas quiméricas de recuperación de dominios no presentaron un reclutamiento claro a las lesiones inducidas por el láser y en general los resultados no fueron concluyentes, lo que podría deberse a cierta reducción en la capacidad de reclutamiento a las DSBs. Algunos ejemplos ilustrativos de los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 77.

### Reclutamiento láser



**Figura 77 | Ensayos de reclutamiento láser.** Resultados característicos obtenidos con proteínas que son reclutadas a las DSBs (53BP1 y su región IRIF). Las proteínas quiméricas de recuperación de dominios (GFP-IRIF\*-PWWP y GFP-IRIF\*-3xMBT-ZnF) no siempre presentaron este patrón de reclutamiento de forma clara.

- El rescate parcial en la formación de focos y en el reclutamiento láser con las proteínas quiméricas de recuperación funcional de dominios hace presagiar que, posiblemente, la interacción constitutiva Tudor-H4K20me<sub>2</sub> podría funcionar de forma cooperativa con la debida a la señal de reclutamiento a las DSBs con su región de reconocimiento (FFR) en 53BP1. Nuestro modelo, por tanto, podría darse en combinación con algún otro más específico, y la unión Tudor-H4K20me<sub>2</sub> podría desempeñar cierto papel en el reconocimiento de las DSBs ayudando a que se diera otra interacción específica en éstas,

además de desempeñar su principal función como responsable del mantenimiento de la localización cromatínica de la proteína.

- En lo que concierne a la parte experimental, los focos formados por los diferentes proteínas quiméricas resultaron en general difíciles de definir, de observar y de cuantificar. Su análisis requiere de su clasificación en focos eficientes e ineficientes, lidiando además con niveles de expresión de la proteína generalmente heterogéneos. Se pensó en abordar esta tarea mediante microscopía de alto rendimiento (HTM), pero esta tecnología no fue capaz de detectar correctamente este tipo de focos para su estudio. Otra opción que se barajó para un futuro fue la generación de líneas celulares de expresión estable, con los niveles adecuados de la proteína que permitieran un análisis automatizado de la formación de focos.

### 1.5. Otros modelos de formación de focos de 53BP1

A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral han ido apareciendo diversas publicaciones que proponían otros modelos alternativos para explicar la formación de focos de 53BP1 (Figura 78). Aunque, en su mayoría, presentan ciertas debilidades e inconsistencias, hemos de advertir que en ningún caso nuestro modelo tiene por qué ser incompatible con ellos. Es más, posiblemente todos los modelos sean en cierta medida plausibles y el mecanismo real del reclutamiento de 53BP1 a las DSBs sea una mezcla de todos ellos, con aspectos de cada uno participando en mayor o en menor extensión dependiendo además del tipo y estado celulares.

#### ➤ Monometilación local de H4K20 en las DSBs por SET8:

Se ha propuesto que existe metilación local de H4K20 en las DSBs por la histona lisina-metiltransferasa SET8 (PR-Set7) (Oda *et al.*, 2010) (Figura 78A). Ante daño en el ADN, tiene lugar la fosforilación  $\gamma$ H2AX, que reclutaría a PCNA. PR-Set7 se uniría a éste a través de sus motivos PIP (PIP1 y PIP2), monometilando H4K20 de forma local en las DSBs. 53BP1 se uniría a H4K20me<sub>1</sub> a través de su dominio Tudor en tándem, siendo así reclutada a las DSBs. Finalmente, la E3-ubiquitina ligasa CRL4 (Cdt2) interaccionaría con PR-Set7 a través de su motivo PIP2, lo que la ubiquitinaría para su degradación proteasómica, mientras que PCNA permanece en el sitio del daño para actuar como plataforma de reclutamiento para otras proteínas de la DDR.

El gran interrogante que plantea este modelo es cómo 53BP1 interaccionaría preferentemente con H4K20me<sub>1</sub> en las DSBs en lugar de con la ya existente antes del daño. Además, el dominio Tudor en tándem reconoce específicamente H4K20me<sub>2</sub>, con mucha mayor afinidad que la forma monometilada. Por otra parte, el papel asignado a PCNA, así como su reclutamiento por  $\gamma$ H2AX, resultan dudosos a todas luces. PCNA está presente en condiciones



de estrés replicativo en horquillas atascadas que no han terminado la replicación, además de actuar en el reclutamiento de las polimerasas de síntesis translesión (TLS).

### ➤ **Dimetilación local de H4K20 en las DSBs por MMSET:**

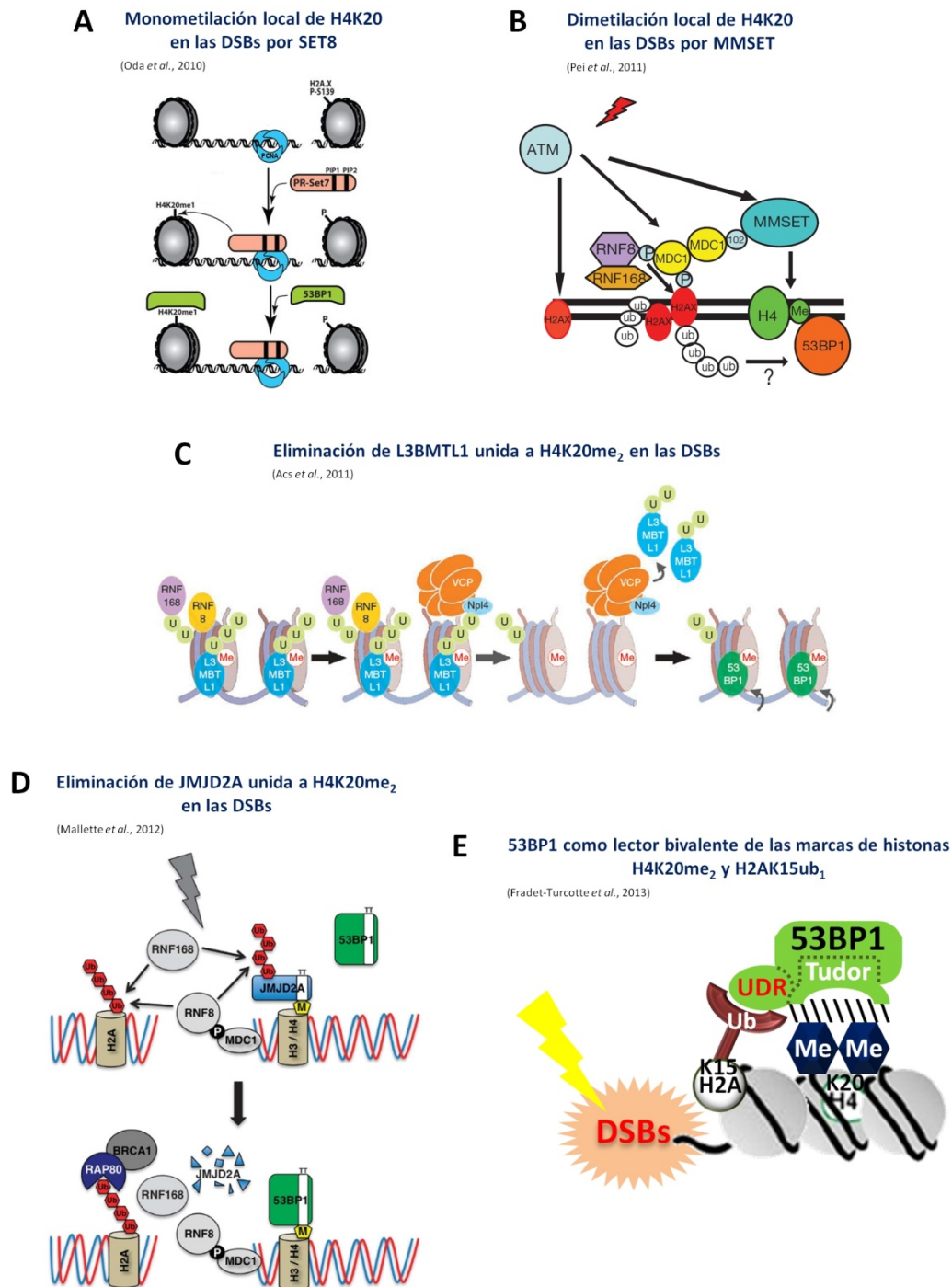
Un trabajo defiende que la histona lisina-dimetiltransferasa MMSET (NSD2, WHSC1) es reclutada a las DSBs de forma dependiente de la ruta  $\gamma$ H2AX-MDC1, en concreto a través de la interacción del dominio BRCT de MDC1 con la S<sup>102</sup> fosforilada de MMSET, donde dimetila H4K20 de forma local, habilitando la unión de 53BP1 a estos sitios (Pei *et al.*, 2011) (Figura 78B). Los mismos autores sostienen que MMSET regula CSR, de forma coherente a esta propuesta (Pei *et al.*, 2013).

Este modelo, a pesar de contar con el apoyo de una investigación previa en la que se describe el reclutamiento de WHSC1 a las DSBs y su capacidad para segurar el estado de metilación de H4K20 y la formación de focos de 53BP1 (Hajdu *et al.*, 2011), generó cierta controversia en el campo, ya que estos datos no han sido reproducidos enteramente por ningún otro laboratorio. Ciertos autores incluso han puesto de manifiesto que la importancia de H4K20me<sub>2</sub> global para la unión de 53BP1 a las DSBs es mayor que la de H4K20me<sub>2</sub> local establecida por MMSET (Hsiao y Mizzen, 2013), mientras que otros estudios han demostrado que la eliminación de MMSET no compromete la respuesta de 53BP1 a las DSBs (Hartlerode *et al.*, 2012). Además, existe la duda de cómo interacciona 53BP1 preferentemente con H4K20me<sub>2</sub> de las DSBs en lugar de con la ya preexistente por todo el genoma antes del daño.

### ➤ **Eliminación de L3MBTL1 unida a H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs:**

Otro modelo postula que la ATPasa AAA VCP (p97), reclutada a las DSBs junto a su cofactor NPL4 gracias a la interacción de éste con las ubiquitinaciones de RNF8, promueve el reclutamiento de 53BP1 por eliminación de las DSBs de L3MBTL1, proteína Polycomb de unión a H4K20me<sub>2</sub> a través de sus tres dominios MBT en tándem (Acs *et al.*, 2011) (Figura 78C). Esta propuesta se ve apoyada por ciertos autores (Stewart, 2012; Mallette y Richard, 2012).

No obstante, no existen evidencias experimentales de que el compactador de cromatina L3MBTL1 esté unido por todo el genoma, y además, como demuestran nuestros resultados, la interacción de 53BP1 con H4K20me<sub>2</sub> sigue produciéndose sin problemas en ausencia de daño, sin que la presencia de L3MBTL1 interfiera en este reconocimiento. Por otra parte, resulta cuestionable la participación de L3MBTL1 en la DDR, ya que el ratón *L3MBTL1* KO, obtenido por nuestro laboratorio, no manifiesta defectos en la DDR y presenta CSR y formación de focos de 53BP1 normales.



**Figura 78 | Otros modelos de formación de focos de 53BP1.** (A) Monometilación local de H4K20 en las DSBs por SET8 (PR-Set7). PCNA recluta a ésta, que deposita la marca H4K20me<sub>1</sub> localmente, la cual es reconocida por 53BP1. (Adaptado de Oda *et al.*, 2010.) (B) Dimetilación local de H4K20 en las DSBs por MMSET. La enzima es reclutada a ellas de forma dependiente de la cascada de fosforilación por ATM y de MDC1. Allí, incrementa la concentración local de la marca H4K20me<sub>2</sub>, a la que se une 53BP1, que probablemente también interaccionaría con las ubiquitinaciones por otros mecanismos. (Adaptado de Pei *et al.*, 2011.) (C) Eliminación de L3MBTL1 unida a H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs. Esto se lleva a cabo por acción de la ATPasa VCP, reclutada a las DSBs por interacción de su cofactor NPL4 con las ubiquitinaciones desencadenadas por RNF8, posibilitando así que 53BP1 se una a H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs. (Adaptado de Acs *et al.*, 2011.) (D) Eliminación de JMJD2A unida a H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs. Esta proteína reconoce esta marca a través de un dominio Tudor en tándem (TT) análogo al de 53BP1. Ante daño en el ADN, las ubiquitinaciones de la ruta RNF8-RNF168 la marcan para su degradación proteasómica, lo que permite que 53BP1 se una a H4K20me<sub>2</sub> a través de su dominio Tudor en tándem en las DSBs. (Adaptado de Mallette *et al.*, 2012.) (E) 53BP1 como lector bivalente de las marcas de histonas H4K20me<sub>2</sub> y H2AK15ub<sub>1</sub>. Además de la interacción constitutiva Tudor-H4K20me<sub>2</sub>, en las DSBs se une a H2AK15ub<sub>1</sub>, producto de las ubiquitinaciones por RNF168, a través de su motivo UDR (Fradet-Turcotte *et al.*, 2013).

### ➤ **Eliminación de JMJD2A unida a H4K20me<sub>2</sub> en las DSBs:**

En otro estudio se ha postulado que la histona lisina-desmetilasa JMJD2A (KDM4A) también se une a H4K20me<sub>2</sub> a través de un dominio Tudor en tándem similar al de 53BP1, lo que inhibiría el reclutamiento de ésta a las DSBs. Pero cuando éstas ocurren, las ubiquitinaciones de la ruta RNF8-RNF168 promoverían la degradación proteasómica de JMJD2A, permitiendo la unión de 53BP1 a las DSBs (Mallette *et al.*, 2012) (Figura 78D).

Aunque esta idea es apoyada del mismo modo que la anterior propuesta (Stewart, 2012; Mallette y Richard, 2012), el principal inconveniente de este modelo es que no se ha demostrado que JMJD2A se encuentre unida por todo el genoma. Otro aspecto contradictorio es que las ubiquitinaciones catalizadas por RNF8 y RNF168 no son las que promueven degradación proteasómica, sino que están destinadas siempre a señalización, aunque ciertos autores defienden que la degradación proteasómica se debería a que en la DDR también tienen lugar las ubiquitinaciones que la propician, que consisten en la formación de cadenas de poliubiquitina unidas a la K<sup>48</sup> de la misma ubiquitina (Mallette y Richard, 2012). Además, al igual que en el modelo anterior, hay que tener en cuenta que nuestros datos indican que la interacción de 53BP1 con H4K20me<sub>2</sub> sigue teniendo lugar aun en ausencia de daño en el ADN. En virtud a nuestro modelo, la marca H4K20me<sub>2</sub> posiblemente podría estar ayudando a JMJD2A a realizar su función del mismo modo que en 53BP1, constituyendo esto una prueba de que nuestro modelo de unión constitutiva a la cromatina es extensible a otras proteínas de la cromatina, relacionadas o no con la DDR.

### ➤ **53BP1 como lector bivalente de las marcas de histonas H4K20me<sub>2</sub> y H2AK15ub<sub>1</sub>:**

El modelo más reciente, propuesto por Dan Durocher, propone que 53BP1 es un lector bivalente de modificaciones de histonas (Fradet-Turcotte *et al.*, 2013) (Figura 78E). En este trabajo, se identifica en 53BP1 un nuevo elemento, el motivo UDR (de reclutamiento dependiente de ubiquitinación, *ubiquitination-dependent recruitment*), que se une al epítipo formado por la marca H2AK15ub<sub>1</sub>, establecida específicamente en las DSBs por RNF168, y sus residuos vecinos, interacción favorecida por el reconocimiento de H4K20me<sub>2</sub> por el dominio Tudor en tándem.

El motivo UDR abarca los residuos 1604-1631, comprendiendo la región RCTD (1613-1631) previamente descrita por Thanos Halazonetis. Este modelo parece ser el más plausible, explicando finalmente cómo 53BP1 reconoce las DSBs. El motivo UDR vendría a ser la FFR predicha por nuestro modelo, y la marca H2AK15ub<sub>1</sub> la señal de reclutamiento de las DSBs previamente desconocida. Aun así, nuestro trabajo aporta el papel de H4K20me<sub>2</sub> como facilitador de la función de 53BP1, por lo que tampoco resulta incompatible con este modelo,

que además responde a la posibilidad de que la unión a H4K20me<sub>2</sub> pudiera estar facilitando en cierto modo el reconocimiento de las DSBs.

➤ **Ácidos nucleicos como posibles requerimientos para la formación de focos de 53BP1:**

Además de los modelos expuestos, otros trabajos anteriores apuntan a la posibilidad de la existencia de otros requerimientos para la formación de focos de 53BP1. Entre ellos destaca el que propone que 53BP1 podría requerir un componente de ARN para su asociación con la cromatina, basándose en que los focos de 53BP1 no se forman con tratamiento con RNasa, pero se recuperan al añadir extractos de ARN nuclear, y además los inmunoprecipitados de 53BP1 contienen moléculas de ARN (Pryde *et al.*, 2005). Este estudio está en la línea de la reciente demostración de que la DDR está controlada por ARNs pequeños no codificantes generados específicamente en la vecindad de los sitios de las DSBs como consecuencia de la actuación de las RNasas Dicer y Drosha, denominándose a éstos DDRNAs (ARNs de la DDR, *DDR RNAs*) (Francia *et al.*, 2012) o diRNAs (ARNs pequeños inducidos por DSBs, *DSB-induced small RNAs*) (Wei *et al.*, 2012).

En ambos casos, el papel del ARN en la formación de focos de 53BP1 y en la DDR en general podría venir dado bien por la posibilidad de que sea necesario un componente genérico de ARN en la cromatina, o bien ante la actuación específica de dichos ARNs. Sin embargo, hay que considerar que el KO condicional de *Dicer* en células B murinas hace que éstas presenten mayores niveles de CSR, fenómeno dependiente de 53BP1, que las wt (Belver *et al.*, 2010). En cualquier caso, el posible requerimiento de ácidos nucleicos por 53BP1 para su correcta actuación está en consonancia con nuestro posterior hallazgo de la capacidad de 53BP1 de unirse a diversas especies de ADN, así como con la presunta identificación de la región SSDB, que podría unirse a ssDNA o incluso a ARN, dada su similitud. No se puede descartar, por tanto, que las interacciones de 53BP1 con ácidos nucleicos, sean ADN o ARN, contribuyan también a su correcto reclutamiento a las DSBs.

## **2. Dominios de unión genérica a cromatina**

### **2.1. ¿Existen los dominios de unión inespecífica a cromatina?**

Una de las principales implicaciones de nuestro modelo de formación de focos de 53BP1 es la existencia de los denominados *dominios de unión genérica a cromatina*, concepto que englobaría a aquellos dominios capaces de interactuar con ésta de forma inespecífica, dirigiendo así a sus proteínas a la cromatina, donde ejercerían su función. Este concepto de unión inespecífica entraría en

conflicto con la especificidad de unión que presentan muchos dominios de reconocimiento de marcas de histonas, como es el caso de gran cantidad de Cromo y Bromodominios. Sin embargo, ambas posibilidades no son excluyentes, de modo que ambos tipos de reconocimientos pueden existir dependiendo de la función del dominio en cada caso. Una unión genérica, inespecífica, a cromatina únicamente mantendría a las proteínas localizadas en ésta, mientras que la unión específica a marcas concretas posibilitaría el reclutamiento a esas zonas determinadas de ciertas proteínas que deden ejercer su función en ese punto.

Los resultados obtenidos en nuestro análisis bioinformático de dominios hiperrepresentados en proteínas de la DDR podrían mostrar ejemplos de ambas categorías de dominios. Los dominios de unión a fosfopéptidos FHA (dominio asociado a Forkhead (*Forkhead-associated domain*) y BRCT (dominio carboxi-terminal de cáncer de mama, *breast cancer carboxy-terminal domain*) suelen estar muchas veces destinados al reconocimiento concreto de ciertas fosforilaciones específicas en determinadas proteínas, los dominios PHD-*finger* (homeodominio de plantas, *plant homeodomain*) suelen presentar muchas variantes destinadas al reconocimiento de metilaciones de histonas específicas y lo mismo ocurre en muchos casos con los Bromodominios reconociendo acetilaciones específicas. Por otra parte, los dominios RRM (motivo de reconocimiento de ARN, *RNA-recognition motif*) de unión a ARN no parecen tener en muchos casos secuencias consenso específicas, por lo que podrían suponer una unión genérica e inespecífica al ARN, que podría ser el que forma parte de la propia cromatina. Algo similar ocurre con los dominios AT-*Hook*, aunque su preferencia por regiones del ADN ricas en AT suele estar más asociada con regiones heterocromáticas. Los dominios PWWP parecen presentar cierta promiscuidad en su reconocimiento de metilaciones de histonas, por lo que probablemente podrían funcionar, al menos en muchos casos, como dominios de unión genérica a cromatina. Por su parte, otros dominios hiperrepresentados en la DDR, como el remodelador de cromatina SNF2 (no fermentable de sacarosa 2, *sucrose non-fermentable 2*) o los dominios Helicasa, presentan actividad catalítica y por tanto se alejan del concepto de dominios de unión.

En el análisis experimental llevado a cabo, prácticamente todos los dominios utilizados en nuestra estrategia de recuperación funcional de dominios podrían ser buenos representantes de la categoría de dominios de unión genérica a cromatina. El dominio Tudor en tándem de 53BP1 es capaz de proporcionar *per sé* afinidad por la cromatina, debido al reconocimiento de la marca ubicua H4K20me<sub>2</sub>. Esto mismo se logra con el dominio PWWP, cuya función era aún desconocida en el momento de inicio de esta tesis. Posteriormente se le asignó al dominio PWWP de la proteína Pdp1 de levadura de fisión el papel de interaccionar con metilaciones de H4K20 (Wang *et al.*, 2009), mientras que más tarde se identificó el dominio PWWP de la proteína MUM1 (EXPAND1), relacionada con la DDR, como módulo de direccionamiento a la cromatina (Huen *et al.*, 2010b). Por su parte, también el dominio MBT de la proteína L3MBTL1, descrito con capacidad de reconocimiento de H4K20me<sub>1</sub> y

H4K20me<sub>2</sub> (Trojer *et al.*, 2007), mostró ser capaz de proporcionar afinidad por la cromatina y recuperación del fenotipo de formación de focos de 53BP1.

Hasta aquí, podemos pensar que los dominios de unión a metilaciones de histonas, o al menos los que reconocen formas metiladas de H4K20, funcionan como dominios de unión genérica a cromatina. Sin embargo, el dominio H15 de la histona H1.2, de unión inespecífica a ADN internucleosómico, además de proporcionar afinidad por la cromatina también fue capaz de rescatar de forma parcial la formación de focos de 53BP1, aunque en menor extensión que los dominios anteriores. Por su parte, los dominios HhH1 y HhH2 (hélice-horquilla-hélice, *helix-hairpin-helix*), de unión inespecífica a ADN, e incluso los dominios RRM y *G-Patch*, de unión inespecífica a ARN, también fueron capaces de recuperar la afinidad por la cromatina en los análisis por FRAP, a niveles equiparables a los de Tudor, PWWP y MBT, si bien no fueron capaces de recuperar la formación de focos de 53BP1, quizá debido al requerimiento esencial de una unión a H4K20me<sub>2</sub> que coopera en el reclutamiento a las DSBs, pero aun así pueden ser considerados también dominios de unión genérica a cromatina, incluso uniéndose a dianas diferentes a las metilaciones ubicuas de histonas. Por su parte, el dominio *AT-Hook*, en concreto las repeticiones 3x*AT-Hook* de la proteína integral de la cromatina HMGA1, no mostró ser un buen dominio de unión genérica a la cromatina, ya que direccionalizó a la proteína específicamente a la heterocromatina, a la cual presentó una unión muy fuerte según el análisis por FRAP. No obstante, este dominio 3x*AT-Hook* podría ser posiblemente considerado un dominio de unión genérica a heterocromatina, capaz de direccionalizar a sus proteínas a ésta.

Aunque los dominios que no reconocen las metilaciones de histonas no fueron capaces de recuperar la formación de focos de 53BP1, la recuperación de la afinidad por la cromatina con ellos y su capacidad de dirigir a sus proteínas a ésta, analizadas mediante FRAP, supone un resultado interesante, ya que nunca antes se ha demostrado experimentalmente que tales dominios sean capaces de llevar a cabo dicha función.

Del mismo modo, es preciso enfatizar que nuestro modelo de actuación en la cromatina a través de dominios de unión genérica a ésta, así como la definición de dicha categoría funcional de dominios, vienen dados, en concreto, por el dominio Tudor en tándem de 53BP1. No obstante, hay que tener en cuenta que existe una gran diversidad de dominios Tudor, englobados recientemente en una familia muy versátil en cuanto a su variedad de reconocimiento de metilaciones de histonas (Lu y Wang, 2013) y por tanto con funciones posiblemente diversas. Curiosamente, el dominio Tudor en tándem de 53BP1 consiste en dos repeticiones del dominio Tudor originalmente descrito en la proteína Tudor de *Drosophila* como módulo de unión a ARN y a ssDNA (Ponting, 1997). Al igual que en el caso de 53BP1, existen proteínas con dos repeticiones Tudor en tándem (JMJD2A) que también reconocen H4K20me<sub>2</sub>, e incluso proteínas con una única repetición Tudor (LBR) que lleva a cabo esta unión. En otros casos, una, dos o más copias del dominio reconocen otras metilaciones de histonas (Lu y Wang, 2013). Dado que la desregulación de proteínas que contienen Tudor se asocia con ciertos desórdenes



humanos, se ha propuesto que la intervención farmacológica en las interacciones mediadas por este dominio podría proporcionar nuevas posibilidades terapéuticas (Lu y Wang, 2013).

Finalmente, cabe destacar que existen ciertas publicaciones que apoyan la existencia de la unión inespecífica a cromatina. El modelo de “escaneo” del ADN por parte de los factores de transcripción antes de unirse a sus secuencias diana específicas constituye una explicación clásica sobre el mecanismo de acción de éstos. Ciertos trabajos recientes lo llevan al contexto de la cromatina, como ocurre en el caso del co-activador transcripcional LEDGF (p75), que también posee un dominio PWWP, y presenta una dinámica en la cromatina basada en un primer paso de “escaneo”/“saltos” y en una posterior unión fuerte, de mayor especificidad, a sus proteínas diana (Hendrix *et al.*, 2011). Otro hecho que refuerza nuestra idea viene dado por la presencia de un dominio PWWP en el extremo N-terminal de ATM de *Arabidopsis thaliana*. Aunque no está presente en sus ortólogos animales, es posible que en ellos la proteína posea algún dominio equivalente, cuya función sería la de localizarla en la cromatina. La búsqueda de este elemento en ATM de mamíferos podría abordarse en un futuro mediante análisis de delección.

## 2.2. Dominios de unión a ARN como dominios de unión genérica a cromatina

De entre los dominios hiperrepresentados en las proteínas de la DDR hallados mediante análisis bioinformático, ocupan un lugar destacado los de unión a ARN, como es el caso de los dominios RRM (motivo de reconocimiento de ARN, *RNA-recognition motif*). La importancia de este hallazgo se ve respaldada por ciertos estudios basados en *screenings* genómicos con siRNAs buscando nuevos reguladores de la DDR, en los que se ha identificado la intervención en ésta de gran cantidad de proteínas de unión a ARN, en concreto de factores de procesamiento de pre-ARNm, como reguladores positivos (Paulsen *et al.*, 2009; Adamson *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que el dominio RRM es uno de los más abundantes en las proteínas eucariotas, presentando una alta variedad en sus interacciones con el ARN y estando implicadas sus proteínas en gran diversidad de procesos biológicos (Cléry *et al.*, 2008).

Todo ello hace presagiar un papel destacado del dominio RRM y otros dominios de unión a ARN en procesos de naturaleza muy diversa relacionados con la cromatina, por lo que podría tratarse de una función de carácter genérico. Hasta la fecha, no se ha encontrado un papel claro de estos dominios en los procesos de la DDR. Aunque en nuestros experimentos los dominios de unión a ARN RRM y G-Patch de la proteína RBM10 transplantados en IRIF\* no rescataron significativamente la formación de focos, sí se observó que, de por sí, ambos presentan una afinidad por la cromatina similar a la de los dominios Tudor, PWWP y MBT. La especial importancia de este resultado radica en que nunca antes se había descrito que dominios de unión a ARN presentaran afinidad por la cromatina, lo cual apuntaría a considerarlos también como dominios de unión genérica a cromatina que posibilitarían que sus proteínas se localizaran en ésta.



Esta hipótesis se ve reforzada por evidencias que muestran que en la cromatina eucariota existe un importante componente estructural de ARN, generalmente en la forma de ARNs inespecíficos de gran longitud que podrían actuar como “andamiaje”, los cuales llegan a suponer hasta el 2-5% de los ácidos nucleicos totales asociados con ella (Rodríguez-Campos y Azorín, 2007). Según nuestro modelo, este ARN genérico de la cromatina podría servir para localizar en ésta gran cantidad de proteínas a través de su reconocimiento por dominios de unión inespecífica a ARN tales como RRM o *G-Patch*, de forma análoga a la interacción de la marca genómica H4K20me<sub>2</sub> con los dominios Tudor, PWWP o MBT, o al reconocimiento inespecífico del ADN por los dominios H15, HhH1 o HhH2.

### **2.3. Equivalencia funcional entre los dominios de unión genérica a cromatina**

La principal consecuencia asociada a la existencia de los dominios de unión genérica a cromatina es la equivalencia funcional existente entre ellos, la cual definiría perfectamente esta categoría. Esto es precisamente lo que demostramos al recuperar la afinidad por la cromatina en las proteínas quiméricas de recuperación funcional de dominios. La función de estos dominios en las proteínas que los contienen no es exclusiva de ellos, ya que pueden ser intercambiados por otros funcionalmente equivalentes.

En nuestro caso, los resultados más evidentes a este respecto fueron los obtenidos con los dominios de unión a metilaciones de histonas (PWWP y MBT) y, en menor medida, con el dominio H15. Todos ellos son capaces de propiciar la localización de la proteína en la cromatina, con rescate de la formación de focos al menos en cierta medida. Teniendo en cuenta también este último aspecto, posiblemente esta equivalencia funcional de dominios sea más acusada entre aquéllos capaces de reconocer la marca H4K20me<sub>2</sub>.

### **2.4. Función de los dominios de unión genérica a cromatina en la DDR y otros procesos relacionados con la cromatina**

Con este trabajo, proponemos un nuevo modelo de unión de proteínas a la cromatina, basado en interacciones adhesivas, continuas y transitorias de dominios de unión genérica a cromatina con marcas epigenéticas de ésta, en especial la marca genómica H4K20me<sub>2</sub>. Estos dominios de unión genérica a cromatina tienen la función de dirigir inespecíficamente a sus proteínas a ésta, permitiéndoles actuar en ella. Así pues, el papel de los dominios de unión a cromatina en la DDR sería el de asegurar un proceso eficiente y rápido, aunque por sí mismos son prescindibles para que se lleven a cabo tales procesos, que en su ausencia serían posibles pero de manera ineficiente. Defectos en estos mecanismos causarían que los procesos relacionados con la cromatina (reparación del ADN, replicación del ADN, regulación transcripcional, regulación epigenética, etc.) sean ineficientes y defectuosos, lo cual puede ser la génesis de ciertas patologías, incluido el cáncer.

Este modelo se puede extender a gran variedad de dominios proteicos funcionalmente equivalentes (tales como la familia Royal) y a sus proteínas, así como, posiblemente, a otras marcas epigenéticas diferentes de H4K20me<sub>2</sub> (modificaciones de histonas, ARNs de andamiaje de la cromatina, etc.). La presencia en proteínas que no pertenecen a la DDR pero que están relacionadas con la cromatina de dominios funcionalmente análogos a Tudor en tándem se explicaría por un fenómeno de convergencia evolutiva, pues se habrían adoptado como estrategia para asegurar que la función de la proteína se lleve a cabo de forma eficiente al mantenerla constitutivamente localizada en la cromatina.

## 2.5. Elementos de reconocimiento para los dominios de unión genérica a cromatina

Una cuestión importante que podemos plantearnos es cuáles serían los elementos que reconocen los dominios de unión genérica a cromatina para llevar a cabo esta función. De forma evidente, el requisito esencial sería que estas señales estén presentes de forma ubicua por toda la cromatina. Atendiendo a este requisito, los elementos de reconocimiento podrían ser marcas epigenéticas de histonas de presencia abundante, ubicua y extendida por todo el genoma, como es el caso de H4K20me<sub>2</sub>, reconocida por los dominios Tudor en tándem, PWWP, MBT y posiblemente el resto de los pertenecientes a la familia Royal; ARNs inespecíficos de la cromatina, que serían reconocidos por dominios tales como RRM o *G-Patch*; o bien algún componente inespecífico del propio ADN (por ejemplo, el esqueleto azúcar-fosfato), reconocido por dominios tales como H15, HhH1 y HhH2.

En nuestro caso, dado que es donde mayor énfasis hemos puesto en nuestras investigaciones, merece especial interés la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> como señal de reconocimiento para los dominios de unión genérica a cromatina. Por su carácter abundante y ubicuo en todo el genoma, y por ser un componente integral de la cromatina, podría ser considerada una marca universal de direccionamiento de proteínas a la cromatina. Es posible que esta misma función, en principio difícil de concretar, sea la responsable de que durante muchos años no se le haya asignado un papel específico a esta marca, más allá de su relación con la DDR a través de 53BP1 y su dominio Tudor en tándem.

Sin embargo, recientemente se ha relacionado H4K20me<sub>2</sub> con el ciclo celular. Un estudio muestra cómo la proteína ORC1, componente del complejo ORC (de reconocimiento del origen de replicación, *origin-recognition complex*), el cual media la licencia de los orígenes de replicación, reconoce específicamente H4K20me<sub>2</sub> a través de su dominio BAH, y sostiene que esta marca está enriquecida en los orígenes de replicación, de modo que esta interacción resulta importante para que se den la replicación y la progresión en el ciclo celular (Kuo *et al.*, 2012). Así, mutaciones en el dominio BAH de ORC1 han sido implicadas en la etiología del síndrome de Meier-Gorlin (MGS), que

transcurre con enanismo primordial (Kuo *et al.*, 2012). No obstante, estos efectos también podrían deberse al fallo en el mecanismo que proponemos de unión a la cromatina, ya que el defecto causado al eliminar la interacción no llega a resultar letal. La replicación y la progresión en el ciclo celular siguen siendo posibles en cierto modo, aunque de forma ineficiente, lo que genera la patología. Por otra parte, otros autores, en un estudio posterior, simplemente asignan un papel a SET8 (PR-Set7) en la licencia de los orígenes de replicación y en el reclutamiento de ORC a éstos que resulta dependiente de las histona lisina-metiltransferasas Suv4-20h1,2, aunque vinculan esta función a la marca H4K20me<sub>3</sub> en lugar de a la dimetilación (Beck *et al.*, 2012). La enzima Suv4-20h2, en concreto, se ha definido también como un componente estructural principal de la heterocromatina que media su compactación y el reclutamiento de las cohesinas a ella (Hahn *et al.*, 2013), otra función que podría estar más relacionada con H4K20me<sub>3</sub>, implicada en regiones heterocromáticas, que con H2K20me<sub>2</sub>.

La importancia de la Epigenética en los mecanismos de unión inespecífica a la cromatina y, por ende, en la función eficiente de las proteínas que actúan en ella, se pone de manifiesto en un trabajo reciente que muestra cómo manipulando artificialmente la epigenética de la célula la DDR en general se ve afectada, induciendo radiosensibilidad en células cancerígenas (Ren *et al.*, 2013).

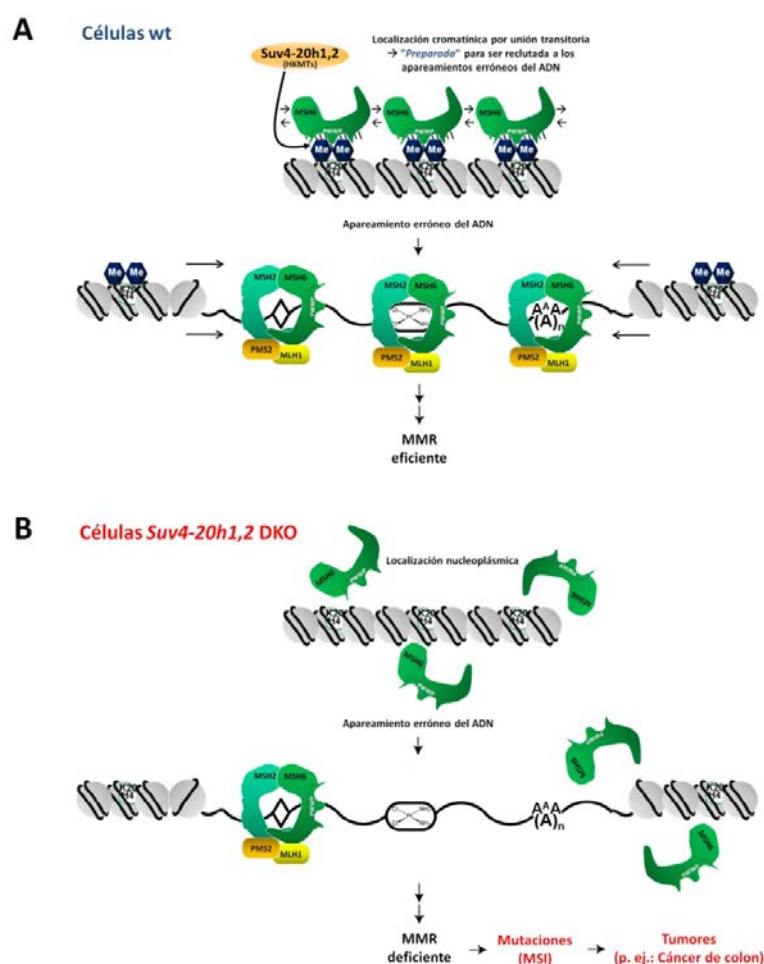
### 3. Funcionamiento de MSH6 en la cromatina en el MMR

#### 3.1. Nuestro modelo para el funcionamiento de MSH6 en la cromatina en el MMR

A través del análisis bioinformático de dominios hiperrepresentados en las proteínas de la DDR en comparación con todas las del proteoma humano, decidimos extender nuestro modelo de funcionamiento en la cromatina de 53BP1 con su dominio Tudor en tándem a uno de estos nuevos dominios encontrados, PWWP, dado que rescataba la función de Tudor en 53BP1 y además debido al especial interés que suscitaba el hecho de que, en el momento de abordar el estudio, su función aún era desconocida. La proteína de la DDR con este dominio escogida fue MSH6, componente clave del mecanismo de reparación de apareamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*). Nuestros resultados indicaron que la pérdida del dominio PWWP de MSH6 causada por mutación crítica de sus aminoácidos más conservados (mutante PWCA) daba lugar a defectos en MMR, de forma que, aunque el proceso era posible, se producía de forma ineficiente. Aunque hasta la fecha no se han descrito mutaciones en el dominio PWWP de MSH6 relacionadas con patologías, este efecto podría ser equivalente a las mutaciones en el dominio PWWP de DNMT3B causantes del síndrome ICF.

Resultados análogos se obtuvieron en células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>. Por otra parte, comprobamos cómo en ausencia de esta marca la localización de la proteína pasa a hacerse más abundante en el nucleoplasma en comparación con lo que ocurre en células wt, con niveles

normales de H4K20me<sub>2</sub>. Estas evidencias, de conjunto, muestran que las células desprovistas de H4K20me<sub>2</sub> presentan un defecto intrínseco de MMR. En su momento, estos resultados tenían la importancia adicional de ser la primera relación descrita entre la Epigenética de modificaciones de histonas y el MMR.



**Figura 79 | Modelo de funcionamiento de MSH6 en la cromatina.** (A) En células wt, MSH6 interaccionaría con H4K20me<sub>2</sub>, marca genómica constitutiva previamente depositada por las histona metiltransferasas Suv4-20h1 y h2, a través de su dominio PWWP, manteniéndose en la cromatina "preparada" para actuar. Cuando en el ADN ocurren apareamientos erróneos, entrecruzamientos o bucles de inserción/delección (IDLs) debidos a microsatélites, MSH6 reconocería rápidamente la lesión, formando el complejo reparador junto a MSH2 (heterodímero MutSα), y MLH1 y PMS2 (heterodímero MutLα), y llevando a cabo el MMR de forma eficiente. (B) En células *Suv4-20h1,2* DKO, desprovistas de H4K20me<sub>2</sub>, MSH6 pasaría a localizarse dispersa por el nucleoplasma, por lo que, aunque podría seguir reconociendo las lesiones, lo haría de modo ineficiente, dando lugar a un MMR deficiente que, en última instancia, generaría MSI y cáncer.

En nuestro caso, estos hallazgos suponen que nuestro modelo para 53BP1 y su dominio Tudor podría extenderse a MSH6 y su dominio PWWP (Figura 79A), funcionando este último como dominio adhesivo de cromatina a través del reconocimiento de la marca ubicua H4K20me<sub>2</sub>, lo que mantendría a la proteína en la cromatina "preparada" para actuar cuando tenga lugar la lesión y propiciando un MMR eficiente. De hecho, acorde con lo esperado, la eliminación de esta modificación

de histonas en células *Suv4-20h1,2* DKO (Figura 79B) no compromete por completo el MMR dependiente de MSH6 (como ocurre al eliminar esta proteína), sino que lo vuelve defectuoso, posiblemente porque la proteína pasa a estar dispersa por el nucleoplasma. Esto indica que PWWP y H4K20me<sub>2</sub>, sin ser esenciales para el proceso, ayudarían a que se lleve a cabo de forma eficiente, como ocurre con la interacción Tudor–H4K20me<sub>2</sub> para la formación de focos de 53BP1. Cabe resaltar que un MMR deficiente, en última instancia, genera un fenotipo mutador que desencadena inestabilidad de microsatélites (MSI, *microsatellite instability*), lo cual es la fuerza conductora de muchos tumores, como por ejemplo el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) (Vo *et al.*, 2005).

### 3.2. ¿En qué medida es extensible a MSH6 el modelo de unión genérica a la cromatina?

A pesar de los resultados obtenidos de deficiencia en MMR en ausencia de H4K20me<sub>2</sub> o con mutación crítica en el dominio PWWP de MSH6, hemos de tener en cuenta que nuestros estudios con MSH6 presentaron dificultades añadidas, de forma que, en cierto modo, aún quedan ciertos aspectos por completar. Por una parte, los resultados de fraccionamiento bioquímico de cromatina, aunque muestran ciertos indicios de una transición de la proteína al nucleoplasma en ausencia de H4K20me<sub>2</sub>, no resultan completamente esclarecedores debido a la localización de MSH6 tanto en la cromatina como en el nucleoplasma y en el citoplasma, tanto en presencia como en ausencia de H4K20me<sub>2</sub>. A esto se añaden las dificultades en el análisis debido a la apoptosis p53-independiente, descrita por ciertos autores (Narine *et al.*, 2010), que sufren las células al sobreexpresar MSH6, lo que impidió el estudio de su afinidad por la cromatina tanto por FRAP como por fraccionamiento bioquímico. Más aún, las proteínas mutantes de MSH6 en su dominio PWWP generadas (PWCA, K99E y PWCA–Tudor), etiquetadas con GFP o con mRFP, formaron fuertes agregados celulares, impidiendo el análisis de su afinidad por la cromatina mediante FRAP.

Por tanto, tenemos aún pocas evidencias de que el fenotipo de deficiencia en MMR observado al eliminar H4K20me<sub>2</sub> se deba al dominio PWWP, aunque aun así nos atrevemos a hacer nuestro modelo extensible a MSH6, ya que los resultados obtenidos en las células carentes de H4K20me<sub>2</sub> son bastante consistentes. Los ensayos de apoptosis inducida por cisplatino mostraron de forma muy clara y reproducible el defecto intrínseco en MMR de estas células. Los ensayos de MSI también lo lograron, aunque hay que puntualizar que el análisis con este sistema informador resulta más tedioso porque los plásmidos requieren de su integración espontánea en el genoma celular para que pueda actuar en ellos la maquinaria del MMR en el contexto de la cromatina con H4K20me<sub>2</sub>, inexistente en el plásmido en su forma episómica. Esto hace que los resultados sean más difíciles de observar, obteniéndose porcentajes de señal muy bajos debido a la baja frecuencia de integración espontánea de los plásmidos informadores de MSI.

Aunque el campo del MMR en relación con la Epigenética de histonas no ha sido muy explorado, recientemente se ha publicado un estudio que profundiza aún más en este aspecto y establece de forma precisa la relación existente entre MSH6 y la cromatina a través de su dominio PWWP. Usando en su mayoría abordajes bioquímicos, los autores describen que el dominio PWWP de MSH6 reconoce la marca H3K36me<sub>3</sub>, lo que permite el reclutamiento de la proteína a la cromatina (Li *et al.*, 2013). Esta marca es especialmente abundante en fases G1 y S temprana, lo que asegura que la proteína esté cargada a la cromatina antes de que ocurran los apareamientos erróneos durante la replicación del ADN. La eliminación de SETD2, la trimetiltransferasa de H3K36, hace que las células presenten MSI, característico de MMR defectuoso. Establecen, además, que el dominio PWWP es prescindible para la función de MSH6 en el MMR, pero esencial para mantener a la proteína en la cromatina (Li *et al.*, 2013). En definitiva, todo lo que este trabajo describe resulta análogo a lo que propone nuestro modelo con la marca H4K20me<sub>2</sub>. Esto podría explicarse considerando que el dominio PWWP de MSH6 podría reconocer con mayor afinidad la marca H3K36me<sub>3</sub> que H4K20me<sub>2</sub>, pero aun así la eliminación de esta última tiene efectos deletéreos para el MMR, como hemos podido comprobar. Con este trabajo, nuestro modelo aplicado a MSH6 y su dominio PWWP no quedaría desechado, sino más bien apoyado, ya que el concepto es el mismo.

### 3.3. Posibles futuros estudios sobre la unión genérica a la cromatina de MSH6

A pesar de que la publicación anteriormente comentada resulta bastante convincente y muestra un trabajo bastante completo, se podrían probar ciertas posibilidades en estudios futuros. Por una parte, se podría analizar el fenotipo de unión a la cromatina (por FRAP o por fraccionamiento bioquímico) de nuestras proteínas mutantes PWCA, K99E y PWCA-Tudor, evitando los efectos deletéreos de la sobreexpresión de MSH6 completa utilizando en lugar de ésta alguna versión reducida de la proteína. Lo esperable sería que los mutantes PWCA y K99E perdieran la afinidad constitutiva por la cromatina, que se recuperaría con el mutante de recuperación PWCA-Tudor. Aunque los resultados así obtenidos serían difícilmente extrapolables al funcionamiento de la proteína completa, al menos serviría para analizar la afinidad por la cromatina en estos mutantes del dominio PWWP, vinculándolo así de manera más directa con los fenotipos observados.

De modo más interesante, y considerando que el trabajo anterior carece de estudios *in vivo*, podrían generarse modelos murinos con deficiencia en la marca H4K20me<sub>2</sub> y, mejor aún, H3K36me<sub>3</sub>, específica en el colon, a través de los KO condicionales de las enzimas Suv4-20h1,2 y SETD2 en este órgano (generándose con la recombinasa CRE bajo el promotor de la Villina, proteína específica del colon), para posteriormente estudiar si en ellos aumenta la tumorigénesis bien por inducción química o por cruzamiento con el modelo de cáncer de colon *Apc<sup>Min</sup>* (neoplasia intestinal múltiple, *multiple intestinal neoplasia*). De hecho, se comenzaron estos estudios para Suv4-20h1,2 y H4K20me<sub>2</sub>, pero finalmente se desecharon debido a los problemas acontecidos con el resto de experimentos.

## 4. Interacción de 53BP1 con el ADN

### 4.1. Interacción de 53BP1 con el ADN *in vitro*

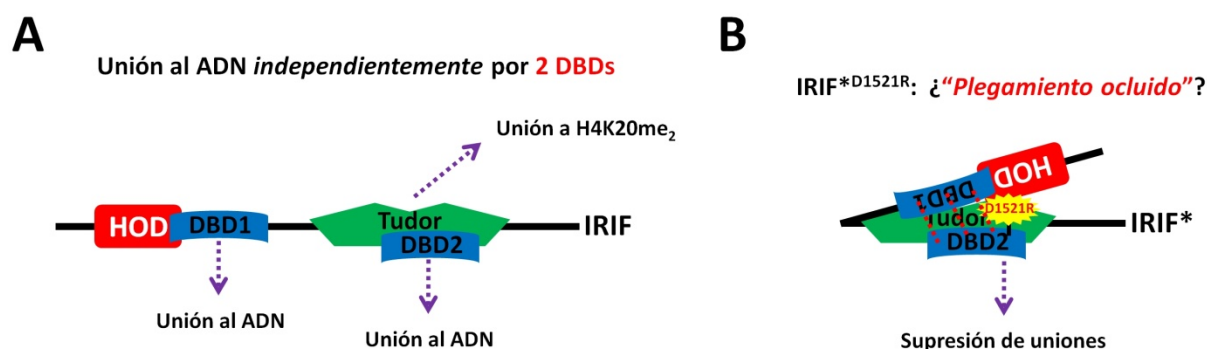
Tal y como ya se ha indicado, en el momento de abordar este proyecto de investigación aún no se conocía el motivo UDR de 53BP1, por lo que quedaba abierto el interrogante de cuál podría ser la verdadera región formadora de focos (FFR) de 53BP1. Tratando de encontrarla, mediante análisis bioinformático hallamos la región SSDB (de unión a ADN de cadena sencilla, *ssDNA-binding*), que sólo aparece en 53BP1 de vertebrados y presenta homología con la región *Clamp head* de la proteína RPOA1, la subunidad A' de la ARN polimerasa ADN-dirigida de arqueas. El hecho de que esta región, con desorden estructural intrínseco y la única en la proteína con estructura no resuelta por cristalografía de rayos X, sea precisamente la que se une al ssDNA en la proteína, unido al hecho de que los genes procariotas que contienen la secuencia homóloga identificada aparezcan en operones relacionados con el metabolismo de los ácidos nucleicos, hizo presagiar que podría unirse a ssDNA.

Se estudió mediante inmunofluorescencia la posibilidad de que esta región pudiera funcionar como FFR, obteniéndose resultados negativos. Más tarde, alentados por la posibilidad de que la región SSDB pudiera estar implicada en unión a ssDNA y por tanto vincular a 53BP1 con el estrés replicativo, se abordó esta hipótesis mediante la producción y purificación de proteínas recombinantes (etiquetadas con GST) procedentes de 53BP1, que fueron analizadas mediante ensayos EMSA usando diversas sondas que se corresponden con distintas estructuras de ADN. Obtuvimos que la región SSDB, en concreto HOD–SSDB, que abarca ésta y el dominio de homo-oligomerización (HOD), no es capaz de unirse por sí sola al ADN, pero que sin embargo la región IRIF (región mínima formadora de focos) de 53BP1 sí presenta una unión destacable al ADN para todas las estructuras analizadas: *ssDNA* (ADN monocatenario), *dsDNA* (ADN bicatenario), *5'-Overhang* (extremo 5'-protuberante), *3'-Overhang* (extremo 3'-protuberante), *Central dsDNA* (tramo de ADN bicatenario central, con extremos 5'- y 3'-protuberantes en una cadena), *Fork* (horquilla), *Bubble* (burbuja) y *3-Way DNA Junction* (“*Chicken Foot*”) (intersección de ADN de 3 vías, “pie de pollo”). Curiosamente, las interacciones más fuertes se obtuvieron para el ADN bicatenario, la estructura burbuja y, en menor medida, el extremo 3'-protuberante. Para comprobar la posibilidad de que esta unión pudiera llevarse a cabo a través de la región SSDB funcionando en el contexto de la proteína IRIF entera, se analizó por EMSA la proteína mutante IRIF  $\Delta$ HOD, cuya delección interrumpe la mayor parte de la región SSDB, pero la interacción con el ADN no se perdió. Del mismo modo, la delección del dominio Tudor en la proteína IRIF  $\Delta$ Tudor tampoco elimina la interacción con el ADN. Sin embargo, el mutante puntual del dominio Tudor, IRIF<sup>D1521R</sup>, sí perdió toda interacción con el ADN, lo cual resultó bastante intrigante.

Una posible explicación de estos resultados, incluso compatibilizada con la hipótesis de que la región HOD–SSDB pueda unirse al ADN en el contexto de la proteína IRIF completa, podría ser que



en la región IRIF de 53BP1 existieran dos dominios de unión al ADN (DBDs, *DNA-binding domains*) que actúen de manera independiente (Figura 80A). Uno estaría localizado en la región HOD–SSDB, posiblemente en la parte no solapante al dominio HOD, y el otro dentro del propio dominio Tudor, que, independientemente, seguiría uniéndose a H4K20me<sub>2</sub> a través de otras interacciones. La pérdida de un DBD no repercutiría en la unión al ADN, ya que se seguiría produciendo por el otro. Sin embargo, el mutante puntual del dominio Tudor (IRIF\*<sup>D1521R</sup>) perdería todas las uniones quizá como consecuencia de un efecto de “plegamiento ocluido” de la proteína que las suprimiría (Figura 80B).



**Figura 80 | Modelo hipotético de la interacción de 53BP1 con el ADN.** Concebido para explicar los resultados obtenidos por EMSA con la región IRIF (región mínima formadora de focos) de 53BP1. **(A)** La unión de la región IRIF de 53BP1 al ADN se produciría por dos dominios de unión al ADN (DBDs, *DNA-binding domains*) independientes, uno en la región HOD–SSDB y otro solapante con el dominio Tudor, que independientemente también se uniría a H4K20me<sub>2</sub>. Si se elimina uno, la unión al ADN se mantendría por el otro. **(B)** El mutante puntual IRIF<sup>D1521R</sup> del dominio Tudor podría adoptar un “plegamiento ocluido” que suprimiría todas estas uniones.

Aunque esta unión al ADN *in vitro* ha quedado demostrada, habiéndose incluso observado las uniones de la proteína IRIF con el ADN mediante microscopía electrónica de transmisión, hemos de ser conscientes de las limitaciones inherentes a este tipo de estudios. Por una parte, nos enfrentamos al hecho de que las predicciones *in silico* no siempre son acertadas ni extrapolables *in vitro*, y menos aún *in vivo*. En otro orden, tenemos el problema detectado del alto índice de oligomerización en las proteínas purificadas (incluso en el mutante IRIF ΔHOD, a pesar de carecer del dominio de homooligomerización), lo que dificultó su análisis por microscopía electrónica, además de abrir la posibilidad de que la interacción con el ADN detectada por EMSA pudiera darse únicamente *in vitro* como consecuencia de esta naturaleza adhesiva de las proteínas purificadas basadas en la región IRIF, que incluso podría ser en sí misma un artefacto de la purificación.

## 4.2. Estudios previos sobre la interacción de 53BP1 con el ADN

El estudio de la proteína 53BP1 se ha abordado tradicionalmente desde el punto de vista de la DDR y en especial de la formación de focos inducidos por radiación ionizante, además de los temas relacionados con su dinámica en la cromatina debido a la presencia de su dominio Tudor en tándem y

la relación de éste con la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub>. Sin embargo, tras los inquietantes resultados globales obtenidos por EMSA y con la hipótesis en mente sobre la explicación de éstos, decidimos ahondar más en la bibliografía sobre 53BP1, encontrando que, con mucha anterioridad y poco después de descubrirse la implicación de la proteína en la DDR, ya se habían realizado estudios que describían su capacidad de unión al ADN:

- Así, el primero de estos trabajos, cuyo autor principal es el mismo descubridor de 53BP1 en el sistema de doble híbrido de levadura, postula que el posible papel de 53BP1 en NHEJ podría llevarse a cabo a través de su interacción directa con el ADN (Iwabuchi *et al.*, 2003). En este estudio, mediante ensayos EMSA y análisis de delección, se muestra que en la región IRIF de 53BP1, denominada como KBD (dominio de unión a cinetocoros, *kinetochore-binding domain*), existen dos dominios de unión al ADN (DBDs), tanto a ssDNA como a dsDNA. Uno de ellos estaría localizado en la región 1319-1480, antes del dominio Tudor y después de la región HOD-SSDB. El otro, en la región 1380-1616, abarcando el dominio Tudor en tándem, descrito como dominio Tudor original (de unión a ARN) más dominio Myb (de unión a ADN, también conocido como SANT). Se muestra que cada uno de estos dos DBDs es capaz de unirse al ADN de forma independiente, aunque también que el dominio Tudor es capaz de formar focos, lo cual hemos rebatido sobradamente en nuestro estudio. Estos resultados, además de apoyar en parte nuestra hipótesis sobre el mecanismo de la unión al ADN por la región IRIF, asignan al dominio Tudor en tándem no sólo la capacidad de unión al ADN, sino también la de unión inespecífica a la cromatina.
- Otro artículo algo posterior describe desde el punto de vista estructural el plegamiento característico del dominio Tudor en tándem, estableciendo que la primera repetición de éste está implicada en unión al tracto RG de la propia región IRIF y al ADN, sugiriendo que el dominio podría mediar interacciones proteína-proteína tanto intra como intermoleculares así como asociaciones proteína-ácidos nucleicos (Charier *et al.*, 2004). Estos resultados, además de poner de manifiesto la posible capacidad del dominio Tudor en tándem para unirse al ADN, predicen la existencia de la homo-oligomerización de 53BP1, aunque asignen este papel al dominio Tudor en tándem. Posiblemente, para ésta sea necesaria, además del dominio HOD, el propio dominio Tudor, aunque también podría darse el caso de que en este trabajo se asignara la función del dominio HOD al Tudor adyacente o incluso, más probablemente, que la unión detectada fuera del dominio Tudor con las argininas metiladas del tracto RG (por la enzima PRMT1), las cuales reconocería de modo secundario debido a su capacidad de unión a metilaciones de proteínas. En cualquier caso, y según lo predicho por nuestra hipótesis sobre el mecanismo de unión al ADN de la región IRIF, se muestra que el dominio Tudor en tándem en realidad es capaz de mediar una serie de complejas

interacciones que también incluyen la unión al ADN, de ahí que el mutante puntual D1521R pudiera ocasionar la pérdida de todas estas uniones.

- Por último, otra publicación describe la metilación en arginina del tracto RG (GAR) de 53BP1 por PRMT1, y que esta metilación es necesaria para la actividad de unión al ADN de 53BP1 (Boisvert *et al.*, 2005). Esto podría suponer que el tracto RG podría ser el DBD localizado en esa zona, pero sin embargo en nuestros estudios *in vitro* con las proteínas purificadas la metilación de esta región no se da al no estar presente la enzima PRMT1, y aun así la proteína sigue uniéndose al ADN.

### 4.3. ¿Existe interacción de 53BP1 con el ADN *in vivo*?

Los estudios realizados muestran que, en cualquier caso, existe una clara interacción de 53BP1 con el ADN, al menos *in vitro*. Sin embargo, si esto es extrapolable o no a lo que ocurre *in vivo* es una cuestión más complicada. Hay que considerar que, *in vivo*, son muchos los factores que podrían intervenir en que esta unión fuera efectiva. Además está el hecho de que la proteína, de por sí, parece tener una naturaleza “pegajosa”, con altísima tendencia a oligomerizar de forma espontánea, con lo que su unión al ADN podría ser en cierto modo fortuita y darse únicamente en el ambiente *in vitro*.

En definitiva, harían falta verdaderos estudios *in vivo* para explorar la posibilidad de que esta unión al ADN se produzca de forma real. Del mismo modo, la posibilidad de que esta unión pudiera contribuir al reclutamiento de 53BP1 a las DSBs es algo que está por demostrar, aunque actualmente podría verse relegado a un segundo plano debido a que la identificación de la región UDR parece haber puesto fin al enigma sobre el mecanismo del reclutamiento de 53BP1 a las DSBs. Así pues, estas cuestiones finalmente se desecharon, ya que se decidió seguir investigando el hipotético papel de 53BP1 en unión a ssDNA y estrés replicativo desde el punto de vista de los puentes de 53BP1-RPA obtenidos por inmunofluorescencia, lo que acabó generando un nuevo proyecto de investigación.

### 4.4. Importancia de la región SSDB de 53BP1

Aunque identificada por medios bioinformáticas, la región SSDB de 53BP1 tiene la importancia de presentar, potencialmente, capacidad de unión al ADN, al parecer tanto mono como bicatenario. Hay que tener en cuenta, además, que esta región es prácticamente coincidente con el dominio HOD. Inicialmente, esta región fue descrita por Thanos Halazonetis como el dominio de homooligomerización (HOD) esencial para la formación de focos de 53BP1, defendiendo que un dominio Tudor en tándem oligomerizado es suficiente para el reconocimiento de las DSBs, ya que HOD puede intercambiarse por otros dominios de oligomerización genéricos conocidos, tales como las cremalleras de leucina, y mantenerse la formación de focos de 53BP1 (Zgheib *et al.*, 2009). Por otra parte, la importancia de esta región fue puesta de manifiesto por los drásticos fenotipos que conlleva su

eliminación, la cual suprime no sólo la formación de focos de 53BP1 ante radiación ionizante, sino también el CSR de las inmunoglobulinas (Bothmer *et al.*, 2011).

Sin embargo, en nuestros experimentos de microscopía electrónica llamó especialmente la atención el hecho de que la proteína recombinante IRIF  $\Delta$ HOD seguía siendo capaz de oligomerizar aun en ausencia de este dominio de homo-oligomerización. Esto podría indicar que esta región realmente no actuaría como dominio de homo-oligomerización, porque ésta podría ser intrínseca a la región IRIF. O bien, que nuestras proteínas recombinantes simplemente oligomerizan de forma artefactual. En cualquier caso, puede proponerse la hipótesis de que, posiblemente, 53BP1 posea una fuerte tendencia intrínseca a homo-oligomerizar de forma espontánea, pero esto podría frenarse en ausencia de DSBs por interacción con H4K20me<sub>2</sub>, que mantendría a la proteína dispersa en la cromatina y sin oligomerizar. Cuando las lesiones tuvieran lugar, el reconocimiento de las DSBs de forma predominante al de H4K20me<sub>2</sub> podría activar en cierto modo la homo-oligomerización local de 53BP1, promoviendo así una mayor retención en las DSBs.

Otro aspecto curioso digno de destacar es que la región SSDB/HOD sólo aparezca en 53BP1 de vertebrados. Esto podría relacionarse con el hecho de que sólo en éstos se da el CSR, para el cual 53BP1 resulta imprescindible. Presumiblemente, se podría especular que la aparición de esta región en la proteína propició el desarrollo del sistema inmune en las especies de vertebrados.

#### **4.5. Posibles futuros estudios sobre la interacción de 53BP1 con el ADN**

Dado que en este apartado también quedan abiertos muchos interrogantes, las posibilidades para futuros estudios incluirían diversos experimentos. En primer lugar, podría llevarse a cabo la observación por microscopía electrónica de las interacciones con el ADN del resto de proteínas recombinantes generadas, además de IRIF, la única observada por este medio. Esto requeriría una purificación más perfecta de todas ellas, a fin de evitar el alto índice de homo-oligomerización espontánea que dificulta las observaciones y hace que los resultados no resulten concluyentes. En la misma línea, también podrían realizarse estas observaciones por microscopía electrónica pero usando un plásmido híbrido de dsDNA y ssDNA, con el objetivo de observar si IRIF se une preferentemente a las interfases entre ambos, posibilidad postulada por nuestras hipótesis iniciales.

Continuando con los ensayos EMSA, sería igualmente interesante tratar de acotar mediante análisis de delección cuál es la región concreta dentro del péptido IRIF que se une al ADN *in vitro*. Esto incluiría determinar si para dicha interacción se requiere el dominio Tudor en tándem completo o sólo una parte, así como la localización precisa de la región SSDB identificada por análisis bioinformático, barajando además la posibilidad de que ambas actúen como DBDs independientes. A este respecto, se debería también analizar por técnicas biofísicas el plegamiento del mutante puntual IRIF<sup>D1521R</sup>, como supresor de toda unión al ADN.

Otra opción, ya relacionada con la extrapolación *in vivo* de las predicciones bioinformáticas y de los estudios realizados *in vitro*, consistiría en la generación de construcciones génicas de 53BP1 entera en las que, siguiendo la estrategia de intercambio de dominios (*domain swapping*) o bien la de recuperación funcional de éstos (por adición a un extremo de la proteína), la presunta región de unión inespecífica a ssDNA, HOD–SSDB, se reemplazaría por otros dominios también de unión inespecífica a ssDNA, tales como los OB-*fold* de RPA por los que ésta reconoce el ssDNA. Tras la generación de líneas de expresión estable, se analizaría en ellas tanto la formación de focos inducidos por radiación ionizante como el CSR. Su recuperación con respecto al mutante  $\Delta$ HOD confirmaría *in vivo* la función clave de esta región en el reconocimiento de ssDNA, así como la relevancia de dicha interacción.



## **B) La respuesta al daño en el ADN asociada a citocinesis (DDR del *midbody*, mDDR)**

La segunda parte de esta tesis doctoral conecta directamente con la primera a través de la proteína 53BP1 mediante el descubrimiento en nuestro laboratorio de un nuevo patrón de inmunofluorescencia de esta proteína en combinación con RPA: Los puentes de 53BP1-RPA (53RBs, *53BP1-RPA bridges*). Por una parte, la hipótesis de que 53BP1 pudiera estar funcionando uniéndose a las interfases de ss/dsDNA en relación con su posible participación en la respuesta a estrés replicativo se abordó con el estudio de la interacción de 53BP1 con el ADN, en la última parte del proyecto anterior. Por otro lado, el patrón de inmunofluorescencia de los 53RBs fue el punto de partida para este nuevo proyecto.

En primer lugar, comenzamos estudiando la relación del *midbody*, la estructura característica de citocinesis, con los 53RBs, dada su similitud estructural y el hecho de que ambas sean estructuras extranucleares conectando núcleos independientes. Encontramos que una gran cantidad de proteínas marcadoras de la DDR colocalizan con Aurora B (AURKB) en el *midbody*, considerando esta última la proteína más característica de éste. Del mismo modo, identificamos la presencia de puentes cromosómicos en cierto porcentaje de *midbodies* y además descubrimos que los tratamientos que generan inestabilidad cromosómica e incrementan la frecuencia de aparición de puentes anafásicos son capaces de causar también alteraciones estructurales en el *midbody*, subrayando ello la relación de éste con el mantenimiento de la integridad genómica. Estos hallazgos nos permitieron identificar la existencia de una DDR asociada a citocinesis y, muy posiblemente, complementaria al *checkpoint* de abscisión citocinética, a la cual bautizamos con el nombre de DDR del *midbody* (mDDR, *midbody DDR*). La relevancia de este descubrimiento resulta crucial, ya que la mDDR nunca antes había sido descrita.

Seguidamente, decidimos caracterizar en detalle la mDDR para entender su funcionamiento y su relevancia. Identificamos los 53RBs como marcadores de la mDDR a tiempos tardíos, constituyendo éstos un indicador claro de la activación local de una DDR en el *midbody*. Relacionados con la respuesta a estrés replicativo y con los cuerpos nucleares de 53BP1 (53BP1 NBs), los 53RBs son además estructuras que representan la rotura de los puentes cromosómicos y se caracterizan por la presencia de actividades relacionadas con la reparación del ADN por recombinación homóloga (HR).



Tratando de trazar el mecanismo molecular subyacente a la mDDR, descubrimos que ésta, y, por tanto, también los 53RBs, dependen de Aurora B y de PLK1, estando directamente ligada a citocinesis en la medida en que el fallo en su mecanismo redunda en la aparición de defectos en esta última, como es la generación de células binucleadas. Finalmente, verificamos nuestra hipótesis de que las endonucleasas de resolución mitóticas, en especial MUS81 y GEN1, podrían estar implicadas en la resolución de los puentes cromosómicos en el *midbody*. En concreto, la actuación de éstas representaría el paso de reparación final en el mecanismo de la mDDR. La mDDR se revela, por tanto, como una respuesta crítica para garantizar la correcta división celular completa y el mantenimiento de la integridad genómica.

## 1. Mecanismo molecular de la mDDR

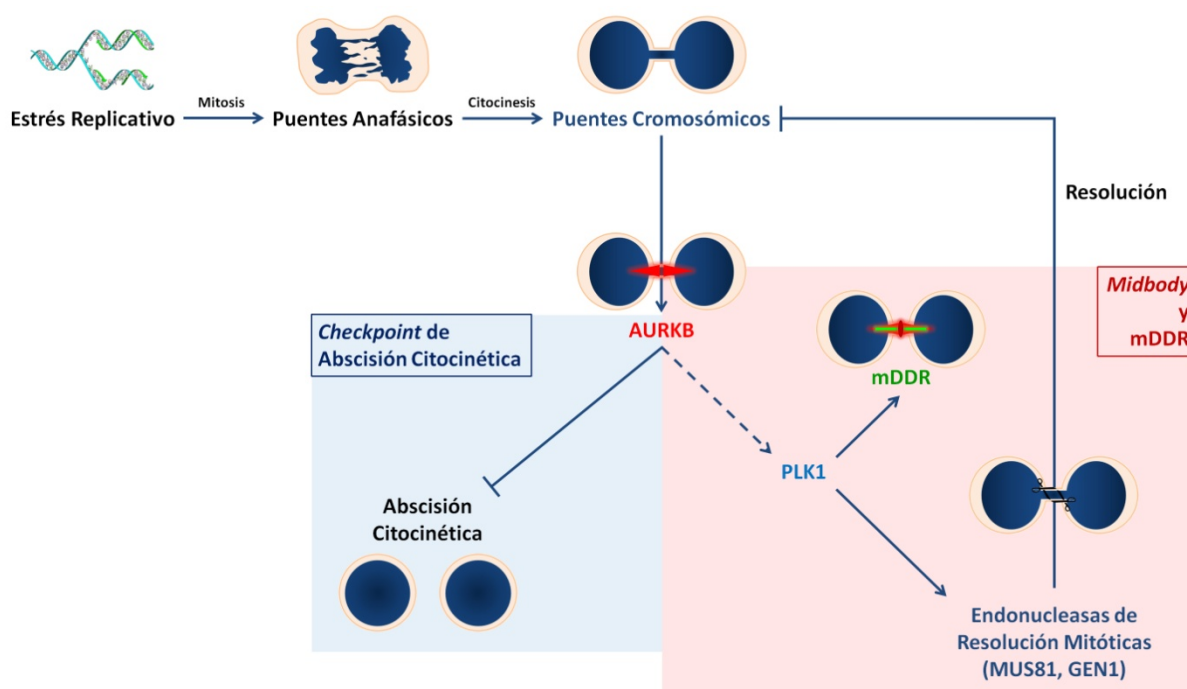
### 1.1. Modelo de activación de la mDDR

Recopilando todos los resultados obtenidos, podemos elaborar un modelo que explique la activación de la mDDR así como sus efectos sobre la citocinesis y el mantenimiento de la integridad genómica (Figura 81). El estrés replicativo promueve la acumulación de regiones de ADN no replicadas, algunas de las cuales persisten en mitosis, donde en anafase dan lugar a puentes anafásicos y, finalmente, en citocinesis, a puentes cromosómicos interconectando los dos núcleos hijos.

En este punto tiene lugar el ensamblaje del *midbody* para propiciar la citocinesis. En el *midbody*, la actividad de Aurora B, por una parte, dispara el *checkpoint* de abscisión citocinética (“*checkpoint NoCut*”) en presencia de estos puentes cromosómicos, lo que inhibe la abscisión. Por otra parte, Aurora B en el *midbody* también activaría a PLK1, y a través de ésta tendría lugar la activación de la mDDR para la reparación del puente cromosómico, con la presencia localizada en el *midbody* de proteínas tales como  $\gamma$ H2AX, KAP1-S824P, SMC1-P, CHK1-S345P, BRCA1, 53BP1, RPA, FANCD2, PICH, MMS21, RAD51, MUS81 y GEN1, así como con la formación de 53RBs a tiempos tardíos.

PLK1 también activaría, por tanto, a las endonucleasas de resolución mitóticas (resolvasas de estructuras de Holliday dobles), en especial a MUS81 y GEN1, cuya actividad localizada permitiría la resolución de los puentes cromosómicos. En ausencia de éstos, por una parte cesaría la mDDR, puesto que ya se ha reparado la lesión, y además se posibilitaría la citocinesis al satisfacerse el *checkpoint* de abscisión citocinética. Las dos células hijas quedarían finalmente separadas sin problemas y manteniendo su integridad genómica.

Este modelo ayudaría además a entender cómo PLK1, una kinasa mitótica, actuaría en fase S en respuesta a estrés replicativo (Takaki *et al.*, 2008; Trenz *et al.*, 2008). Nuestra propuesta es que, más bien, PLK1 actuaría en mitosis para resolver un problema que se originó en fase S.



**Figura 81 | Modelo de activación de la mDDR.** El estrés replicativo, caracterizado por la generación de ssDNA en regiones de replicación incompleta, genera en mitosis puentes anafásicos, que, al término de ésta, dan lugar a puentes cromosómicos conectando las dos células hijas en separación durante la citocinesis. Estos puentes cromosómicos activarían el ensamblaje del *midbody* por Aurora B. En él, Aurora B inhibe la abscisión citocinética mientras los puentes cromosómicos estén presentes, a través del *checkpoint* de abscisión citocinética. Por otra parte, también en el *midbody*, Aurora B a través de PLK1 (interacción aún no demostrada) activaría la mDDR, incluyendo la formación de los 53RBs. PLK1 se encargaría también de activar a las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1, encargadas de la resolución de los puentes cromosómicos.

## 1.2. Limitaciones de nuestro modelo de activación de la mDDR

Nuestro modelo asigna una clara relevancia biológica a la mDDR, pero hemos de ser conscientes de que presenta ciertas limitaciones que deberían ser resueltas en futuros estudios:

- La limitación más prominente es que no está demostrada la activación de PLK1 por Aurora B en la mDDR. Únicamente existe un trabajo que muestra esta activación, pero en los centrómeros en metafase (Carmena *et al.*, 2012). Esta cuestión debería abordarse convenientemente mediante las aproximaciones bioquímicas pertinentes.
- Aunque hemos demostrado que la formación del *midbody* y la activación de la mDDR dependen de Aurora B y de PLK1, ya que la inactivación de cualquiera de las dos suprime el ensamblaje del *midbody* y la mDDR (la formación de 53RBs), además de generar gran cantidad de binucleación, queda por demostrar también la activación de los componentes de la mDDR por ambas proteínas.
- Igualmente, se debería confirmar en nuestro modelo la activación de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1 por PLK1, aunque existen ciertos trabajos que

muestran que ésta tiene lugar y se da de forma coordinada en mitosis (Matos *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013).

- Por otra parte, también debería estudiarse con detalle la activación de Aurora B en el *midbody*. Se ha propuesto que ésta podría venir dada desde el inicio de mitosis por CHK1 (Zachos *et al.*, 2007), aunque en el caso concreto de la citocinesis y la activación de la mDDR es más probable que guarde alguna relación con ella la propia condensación cromosómica o la misma cromatina, dada su relación con los puentes cromosómicos, ante los que responde Aurora B.

### 1.3. Efectos de la alteración experimental de la mDDR

El modelo propuesto plantea distintas situaciones experimentales con las que puede alterarse la mDDR, todas ellas exploradas en nuestras investigaciones:

- **Inhibición de las endonucleasas de resolución mitóticas:** El efecto de la inhibición de este último paso de la reparación de los puentes cromosómicos sería que se mantiene activada de forma “persistente” la mDDR, con lo que se incrementaría el número de 53RBs observados. En el caso de que transcurra mucho tiempo sin repararse la lesión, se produciría el “colapso” o el fallo del *checkpoint* de abscisión citocinética, o bien simplemente no podría ser mantenido conforme la célula progresa en el ciclo celular debido a la caída de actividad de Aurora B, con lo que la citocinesis tendría lugar de forma errónea, incrementándose la binucleación. Esto es lo que observamos con el *knock-down* de las endonucleasas de resolución mitóticas (MUS81, GEN1 y SLX4).
- **Concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*:** En consecuencia, se repararían más eficientemente los puentes cromosómicos. La abscisión citocinética dejaría de estar inhibida por Aurora B, con lo que se completaría la citocinesis de forma normal. La mDDR dejaría antes de estar activa, ya que se han reparado las lesiones, con lo cual el número de 53RBs observados disminuiría. Estos efectos son los obtenidos con las líneas celulares que expresan las proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG.
- **Inhibición de Aurora B o de PLK1:** En esta situación, no se activaría la mDDR (se suprimiría la formación de 53RBs) ni se ensamblaría el *midbody* (disminuiría drásticamente el número de *midbodies* formados). El *checkpoint* de abscisión citocinética no se activaría, con lo que se fuerza la citocinesis, que, a su vez, se produciría en presencia de puentes cromosómicos no resueltos, ya que las endonucleasas de resolución mitóticas no serían activadas. Como resultado, en células animales la citocinesis no puede producirse correctamente, tiene lugar la regresión del surco de división y aparecería binucleación, con

la consiguiente tetraploidización celular. En levaduras, en cambio, el resultado equivalente sería el corte “patológico” del ADN localizado en el puente cromosómico, proceso que en células animales no tiene lugar, produciéndose en ellas en lugar de éste la binucleación por mecanismos aún desconocidos (Steigemann *et al.*, 2009; Steigemann y Gerlich, 2009; Agromayor y Martín-Serrano, 2013). Esta situación es la que observamos experimentalmente al aplicar tratamientos con inhibidores de Aurora B o de PLK1.

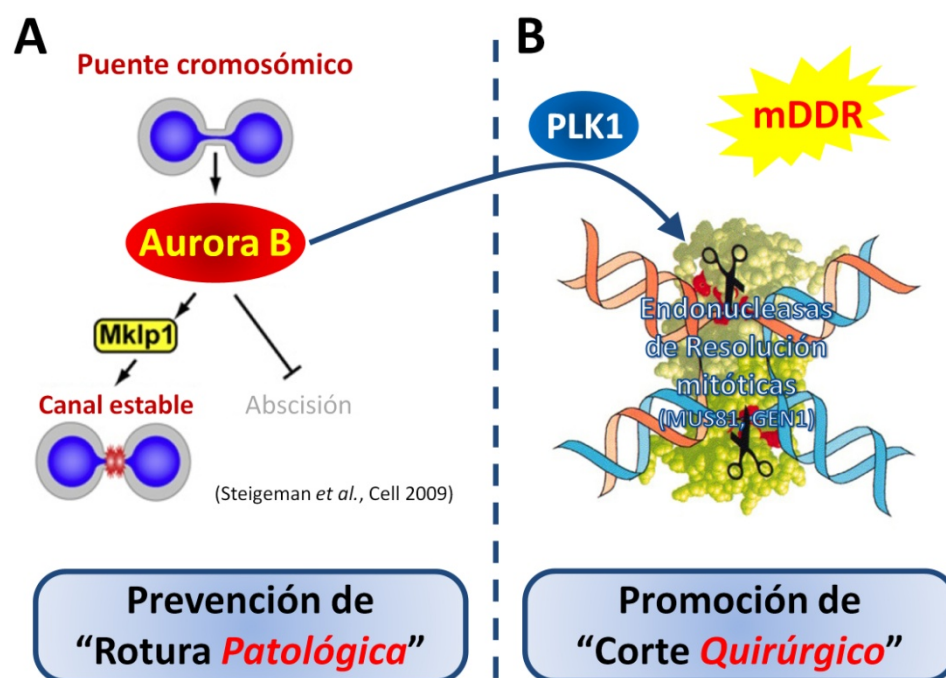
- **Inhibición de Aurora B o de PLK1 con concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody*:** En este caso, a pesar de no contar con la actividad de Aurora B o de PLK1, la concentración de las resolvasas MUS81 y GEN1 en el *midbody* resultaría suficiente para la resolución de los puentes cromosómicos, que quedarían por tanto reparados. Sin embargo, la formación del *midbody* y la activación de la mDDR (la formación de 53RBs) no tendrían lugar, al estar inhibida Aurora B o PLK1. En definitiva, se produce un rescate de la citocinesis sin activación de la mDDR. Tampoco se daría la inhibición de la abscisión por Aurora B en el *checkpoint* de abscisión citocinética, con lo que se fuerza la citocinesis, pero ésta sería normal dado que se han reparado los puentes cromosómicos. Esto fue lo observado al aplicar los tratamientos de inhibición de Aurora B o de PLK1 en las líneas celulares expresando 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG. En este caso, llama especialmente la atención el hecho de que se dé la citocinesis sin que se detecte el *midbody* de Aurora B, lo cual se explicaría en base a las siguientes consideraciones:

1. Aurora B o PLK1 están inhibidas.
2. Aurora B no está en el *midbody* debido a su inhibición o a la de PLK1, pero éste sigue formándose y está ahí con el resto de sus componentes (complejo ESCRT-III, microtúbulos, tráfico vesicular, etc.), lo cual, a su vez, posibilita el reclutamiento al *midbody* de las proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG a través del dominio MIT fusionado.
3. Los *midbodies* no persisten, al ser reparados los puentes cromosómicos con especial rapidez y eficiencia.
4. Las endonucleasas de resolución mitóticas y, más concretamente, la resolución de los puentes cromosómicos, podrían activar otra vía de citocinesis alternativa a la de AURKB-PLK1, con lo que en la situación experimental descrita se estaría *bypasseando* la ruta de citocinesis.

## 1.4. Importancia de la mDDR

La mDDR, como proceso celular descrito por vez primera, presenta ciertas características que le otorgan una especial relevancia fisiológica:

- ✓ **Asegura la completa división celular y el mantenimiento de la integridad genómica:** Como hemos visto, la mDDR posee una importancia crítica en este sentido, ya que propicia una segregación cromosómica correcta.
- ✓ **Evita tetraploidización y aneuploidías:** Al proteger frente a defectos de segregación cromosómica, la mDDR evita la tetraploidización y se previenen las aneuploidías que, en muchos casos, son la génesis del cáncer (Fujiwara *et al.*, 2005; Ganem *et al.*, 2007).
- ✓ **Hace que el *midbody*, más que una estructura casual, se revele como una estructura fisiológica implicada en la reparación del ADN:** A través de la mDDR, el *midbody* protegería frente a regiones de ADN mal segregadas, como son los puentes cromosómicos.
- ✓ **Actúa junto con el *checkpoint* de abscisión citocinética:** La mDDR tiene una función complementaria a la de éste. Ante la presencia de puentes cromosómicos de ADN mal segregado, por un lado es necesario evitar que se produzca la abscisión citocinética, pero por otro es preciso promover la reparación de ese ADN mal segregado, misión primordial de la mDDR. Este último mecanismo no había sido descrito nunca antes en la bibliografía, aunque su existencia era en cierto modo evidente y podía presuponerse.
- ✓ **Asigna a Aurora B un papel dual en el *midbody* durante citocinesis:** De este modo, Aurora B, mediante su localización en el *midbody*, tendría dos funciones en citocinesis (Figura 82):
  - 1) Por una parte, previene la “rotura *patológica*” de los puentes cromosómicos y la tetraploidización celular al inhibir la abscisión por activación del *checkpoint* de abscisión citocinética (Figura 82A), función ya conocida (Steigemann *et al.*, 2009).
  - 2) Por otra parte, promueve el “corte *quirúrgico*” de los puentes cromosómicos al activar la mDDR, permitiendo la reparación de éstos por las endonucleasas de resolución mitóticas, activadas por Aurora B posiblemente a través de PLK1 (Figura 82B). Ésta es la nueva función, no descrita hasta la fecha, que asignamos a Aurora B como disparador de la mDDR.



**Figura 82 | Papel dual de Aurora B en el *midbody* durante citocinesis.** (A) Aurora B previene la "rotura patológica" de puentes cromosómicos durante citocinesis, a través de la activación del *checkpoint* de abscisión citocinética, que previene la tetraploidización. (Adaptado de Steigemann *et al.*, 2009.) (B) Al mismo tiempo, Aurora B también promueve el "corte quirúrgico" de puentes cromosómicos durante citocinesis, mediante el disparo de la mDDR y la activación, mediada posiblemente por PLK1, de las endonucleasas de resolución mitóticas.

### 1.5. Relación de Aurora B con la cromatina en la mDDR

La activación de la mDDR por Aurora B en respuesta a puentes cromosómicos implicaría que, de algún modo, esta proteína es capaz de captar la presencia de cromatina mal segregada. En levaduras, se ha puesto de manifiesto que Ipl1, el ortólogo de Aurora B en *S. cerevisiae*, es activada por cromatina en la zona media del huso mitótico para disparar el "*checkpoint NoCut*" (Mendoza *et al.*, 2009). Aunque esto aún no se ha verificado en células animales, nuestros estudios sobre la relación de la mDDR con la condensación cromosómica muestran que existen restos de cromatina hipercondensada, con SMC2 unida, en los *midbodies* tempranos desde que se inicia su formación en telofase. De esto puede deducirse que Aurora B podría dirigir la formación del *midbody* en torno a remanentes de cromatina hipercondensada que se encuentran en la zona media del huso mitótico y que, posteriormente, constituirán los puentes cromosómicos de ADN mal segregado.

Llama especialmente la atención el hecho de que se desconozca el mecanismo por el cual, en mitosis, Aurora B se transfiere de los cinetocoros de los cromosomas metafásicos a la zona media del huso mitótico. No sería descabellado hipotetizar que el disparador de tal mecanismo podría ser la presencia de cromatina en esta zona, o incluso algún ARN relacionado con ésta. En este sentido, ciertos trabajos han puesto de manifiesto que la correcta localización de Aurora B en los cinetocoros se

vincula a la presencia en los niveles adecuados de transcritos no codificantes de los satélites menores murinos (Bouzinba-Segard *et al.*, 2006), e incluso que Aurora B se asocia con estos ARNs, los cuales potencian su actividad (Ferri *et al.*, 2009).

Otro indicativo de las relaciones e incluso de la asociación de Aurora B con la cromatina viene dado por nuestros experimentos de inducción de formación de *midbodies* aberrantes con tratamientos que generan inestabilidad genómica. Los *midbodies* aberrantes, estudiados y clasificados en base al patrón de localización de Aurora B en ellos, podrían deberse a que ésta sigue la “senda” del ADN o de la cromatina (o ARN asociado a ésta), lo que explicaría que, por ejemplo, las alteraciones topológicas del ADN inducidas por la inhibición de TOPO-II hicieran que el *midbody* de Aurora B adoptara esa morfología “*ramificada*” característica.

No obstante, a pesar de las evidencias experimentales obtenidas y de las hipótesis formuladas, sería necesario demostrar la interacción de Aurora B con remanentes de cromatina, ya sean en la forma de restos de SMC2, ARNs o incluso ssDNA generado como consecuencia del estrés replicativo. Ello ayudaría, sin duda, a trazar la formación del *midbody* en torno a los puentes cromosómicos, lo cual sería coherente con la activación de la mDDR para su resolución.

## 2. Puentes de 53BP1-RPA (53RBs)

### 2.1. Significado biológico de los 53RBs

En nuestro estudio, identificamos los 53RBs como marcador de la mDDR, por lo que resulta esencial comprender cuál es su significado biológico y lo que representan. Esto se remarca en la Figura 83 y se relaciona a continuación:

#### 1) Nueva estructura celular marcador de la activación de la mDDR:

Los 53RBs constituyen una nueva estructura citológica, nunca antes descrita, de la cual 53BP1 forma parte de un modo bastante inusual, ya que, a diferencia de los focos inducidos por radiación ionizante o incluso de los 53BP1 NBs, se trata de puentes extranucleares que interconectan núcleos hijos aparentemente independientes en fase G1.

Su relación con la mDDR viene dada por el hecho de que constituyen marcadores de la activación de ésta a tiempos tardíos, como demuestra el hecho de que únicamente sean visibles en las células tras un mínimo de 48 h en cultivo y la colocalización de sus ramas de 53BP1 con los *midbodies* tardíos, persistentes, de morfología “*alargada*”, correspondiéndose la zona central de RPA con la zona oscura del *midbody*. Por otra parte, cierto porcentaje de ellos contiene



puentes cromosómicos visibles al DAPI, mientras que en todos ellos se detecta la presencia de ssDNA en su zona central, donde se encuentra RPA, conocida proteína de unión a éste.

## 2) “Marcas” de las lesiones generadas por estrés replicativo:

La presencia en los 53RBs de RPA y ssDNA los relaciona con el estrés replicativo, además de su aparición entre células que contienen 53BP1 NBs, estructuras generadas como consecuencia de éste. Así, al igual que los 53BP1 NBs, la formación de 53RBs se ve incrementada en condiciones de estrés replicativo leve, como es el tratamiento con APH 0.2  $\mu$ M, lo cual resulta coherente con nuestro modelo sobre la activación de la mDDR como consecuencia del estrés replicativo.

Además, la formación de 53RBs también se induce por la depleción de BLM, al suprimir la vía de disolución (por el complejo BTR, BLM–TOPO–III $\alpha$ –RMI1/2) para la reparación de los puentes cromosómicos, aunque esta no sea la vía de reparación preferente ante las lesiones causadas por el estrés replicativo leve. Efectos incluso más acusados se obtienen con la depleción de las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81, GEN1 y SLX4 en condiciones de estrés replicativo leve, lo que demuestra que la resolución es la vía preferente de reparación de los puentes cromosómicos generados por este estímulo. Por el contrario, la concentración de éstas en el *midbody* con las proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG disminuye la formación de 53RBs, ya que al resolverse más eficientemente los puentes cromosómicos la mDDR deja antes de estar activa.

Por tanto, los 53RBs representan, al fin y al cabo, la activación de la mDDR. Serían una especie de “cicatrices” de una lesión en el ADN, el puente cromosómico, que aún no ha sido completamente reparada.

## 3) Rotura de puentes cromosómicos:

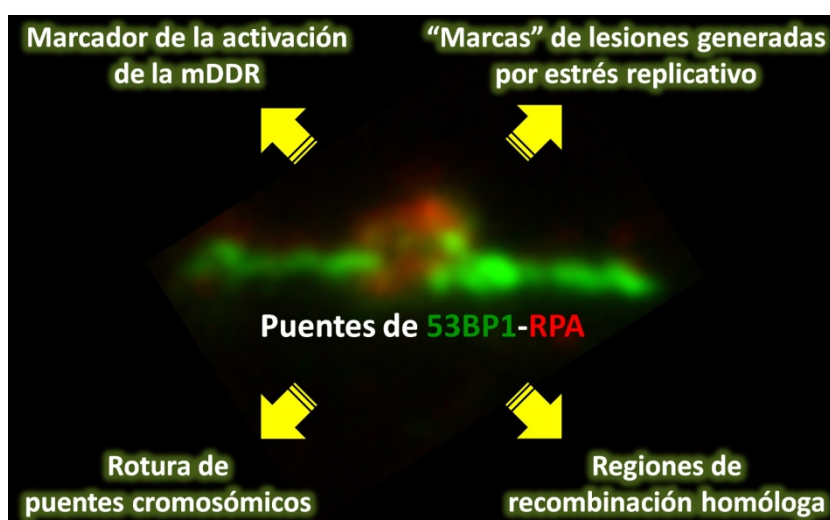
Una de las características más interesantes observadas en los 53RBs, y la cual define los mecanismos de su formación y de la reparación que tendría lugar en ellos, es el hecho de que se originen principalmente por rotura de puentes cromosómicos. La presencia en los 53RBs de ssDNA y de RPA, como consecuencia del estrés replicativo, podría deberse bien a su correspondencia con horquillas de replicación atascadas, sin generación de DSBs, o bien con horquillas colapsadas, en las cuales se generan DSBs que se reparan por HR previa resección. Comprobamos que la señal de RPA de los 53RBs depende de resección, lo que apunta a que estas estructuras se corresponden con la segunda posibilidad. Este colapso se produciría como efecto de la condensación cromosómica y de la tensión mecánica debida tanto a la segregación cromosómica mitótica como a la separación de las dos células hijas por migración celular.

#### 4) Regiones de recombinación homóloga:

El hecho de que los 53RBs contengan ssDNA y RPA, y de que en ellos se esté produciendo resección, de la cual depende la señal de esta última, indica que son regiones donde se está produciendo reparación por HR. De forma consistente con esto, BRCA1, proteína característica de HR, se localiza en la zona central de RPA y ssDNA de los 53RBs. Además, entre las proteínas de la DDR detectadas en el *midbody* se encuentra RAD51, marcador de HR, precisamente en la zona oscura central, así como las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1, cuya misión es la de resolver las estructuras de Holliday dobles (dHJs) generadas en los últimos pasos de la HR.

Una cuestión importante en relación a los 53RBs y a la mDDR es por qué en ellos la reparación de los puentes cromosómicos se da por HR. Esto se explicaría en base al hecho de que, generalmente, los puentes cromosómicos se generan a partir de cromátidas hermanas (Chan *et al.*, 2009; Muñoz-Galván *et al.*, 2012), en muchos casos debido a la concatenación de ADN como efecto del estrés replicativo (Chan *et al.*, 2009), al acumularse estructuras de ADN intermediarias de replicación, la cual es especialmente incompleta en estas condiciones. Los sitios frágiles comunes (CFSs) serían además los principales candidatos a sufrir estos efectos (Chan *et al.*, 2009).

En este contexto, la zona central de RPA del 53RB marcaría una región donde se está produciendo resección de forma activa. Por su parte, en las ramas del 53RB, 53BP1 se uniría inmediatamente a las DSBs generadas por el colapso de las horquillas de replicación donde ésta es incompleta como consecuencia del estrés replicativo. De hecho, por microscopía confocal de súper-resolución (STED) puede comprobarse cómo el “puente” de 53BP1 se corresponde en realidad con pequeños “microfocos” de esta proteína, que son de menor intensidad en la zona central de RPA, donde 53BP1 sería desplazada de las DSBs para su reparación por HR.



**Figura 83 | Significado biológico de los 53RBs.** Detalle de un 53RB fresco del día, sobre el que se representan las principales características relacionadas con su significado biológico.

## 2.2. Condiciones para la formación de 53RBs

En nuestros estudios de los 53RBs, llamó especialmente la atención el hecho de que no se detectaran en PMEfs ni en células 3T3, sino únicamente en líneas celulares tumorales humanas, como U2OS, nuestro modelo de estudio, y HeLa, A549 y MCF-7. El hecho de que en estas tres últimas los 53RBs mostraran una morfología “vestigial” y de que no se detectaran en los otros tipos celulares podría deberse a que poseen una menor carga de estrés replicativo intrínseco con respecto a las células U2OS, caracterizadas por los altos niveles de éste. O bien, también podría deberse a una menor separación celular tras la citocinesis, lo que explicaría por qué estas estructuras tampoco han sido observadas en tejidos *in vivo*, donde cada célula suele ocupar su nicho concreto sin desplazarse. Incluso, parece ser que los 53RBs se pierden al suprimir la adhesión de las células al sustrato, como ocurre en los experimentos de *shake-off* mitótico.

El hecho de que la formación de 53RBs sólo se aprecie tras 48 h de cultivo celular puede explicarse en base a dos factores. El primero se relaciona con lo anterior, considerando que la preservación de estas estructuras requiere de la adhesión celular al sustrato además de la migración celular en cultivo. Por otra parte, este periodo de tiempo en cultivo se corresponde con 1 (al menos) ó 2 ciclos celulares completos en células U2OS, que puede ser el tiempo necesario para que tengan lugar los efectos del estrés replicativo y la persistencia del *midbody* hasta alcanzar su estadio tardío.

## 2.3. Posibles funciones de 53BP1 en los 53RBs

Con respecto a la función de 53BP1 en los 53RBs, podemos hipotetizar acerca de diversas posibilidades, aún por demostrar experimentalmente:

1. **Unión a las DSBs recién generadas por colapso de las hoquillas de replicación:** Ésta sería la función más obvia y convencional de 53BP1 en los 53RBs.
2. **Limitar resección, posiblemente en las interfases de ss/dsDNA:** Esta función, posiblemente la principal, está acorde con las primeras hipótesis que emitimos sobre el significado biológico de los 53RBs, y podría relacionarse con la capacidad de 53BP1 para unirse al ADN. La finalidad de esta función podría ser evitar que se dé HR en las regiones donde no exista homología con la cromátida hermana, o bien simplemente evitar la generación de ssDNA y la extensión de los efectos del estrés replicativo.
3. **Protección frente a estrés replicativo:** En la misma línea que los 53BP1 NBs, posiblemente marcando las mismas regiones que éstos, los sitios frágiles del genoma, pero en este caso localizados en puentes cromosómicos interconectando dos núcleos hijos.

4. **Inducción de descondensación local de la cromatina en las regiones hipercondensadas del puente cromosómico en reparación:** Se llevaría a cabo a través de la interacción de 53BP1 con el factor remodelador de cromatina EXPAND1 (MUM1) (Huen *et al.*, 2010b).
5. **Promover la reparación de lesiones heterocromáticas en los puentes cromosómicos:** Según el mecanismo por el cual 53BP1 posibilita la activación robusta y localizada del factor KAP-1 (Noon *et al.*, 2010).

## 2.4. Papel de la condensación cromosómica en la formación del *midbody* y de los 53RBs

Como ya hemos comentado, la formación del *midbody* se relaciona con la condensación cromosómica en la medida en que, acorde con nuestras observaciones, Aurora B parece dirigir la formación del *midbody* en torno a remanentes de cromatina hipercondensada. Tratando de estudiar si existe alguna relación similar entre los 53RBs y la condensación cromosómica, y extrapolando el hecho de que la formación de los 53BP1 NBs requiere que ésta tenga lugar, hallamos que la formación de 53RBs también requiere que la condensación cromosómica se produzca de forma correcta. Más allá de esto, demostramos que la mDDR y la correcta segregación cromosómica requieren que la condensación cromosómica tenga lugar de forma adecuada. Defectos en condensación cromosómica, como los que tienen lugar al eliminar los complejos condensina (en nuestro caso, la condensina SMC2), causan una disminución en el ensamblaje del *midbody* y en la formación de 53RBs y de 53BP1 NBs, así como un incremento en los UFBs en células en división y una mayor incidencia de binucleación.

El papel de la condensación cromosómica en la formación de 53RBs podría venir dado por el hecho de que esta hipercondensación de la cromatina genera fuerzas mecánicas que hacen que las horquillas de replicación atascadas, las cuales se corresponden con regiones del genoma “sub-replicadas” que sufren los efectos del estrés replicativo como es el caso de los sitios frágiles comunes (CFSs), pasen a colapsarse, generando las DSBs que son marcadas por el 53RB. Este modelo sería el mismo que el que explica la formación de los 53BP1 NBs dependiente de condensación cromosómica (Lukas C. *et al.*, 2011). También se ve respaldado por nuestras observaciones de que RPA es reclutada a los sitios especialmente ricos en SMC2 y, por tanto, hipercondensados, desde anafase, para dar lugar seguidamente a puentes telofásicos de SMC2-RPA que perduran hasta telofase tardía y que podrían ser las “guías” sobre las que Aurora B ensamblaría el *midbody*, para acabar dando lugar en interfase a los 53RBs. No obstante, recientemente se han publicado ciertos estudios que defienden que los CFSs podrían sufrir rotura controlada por las resolvasas ERCC1 y MUS81-EME1 y por la helicasa de disolución BLM en mitosis, en vez de deberse ésta a la propia condensación cromosómica, y que esto permitiría el correcto mantenimiento de la integridad genómica y prevendría la rotura cromosómica descontrolada (Naim *et al.*, 2013; Pellicioli y Muzi-Falconi, 2013; Ying *et al.*, 2013).

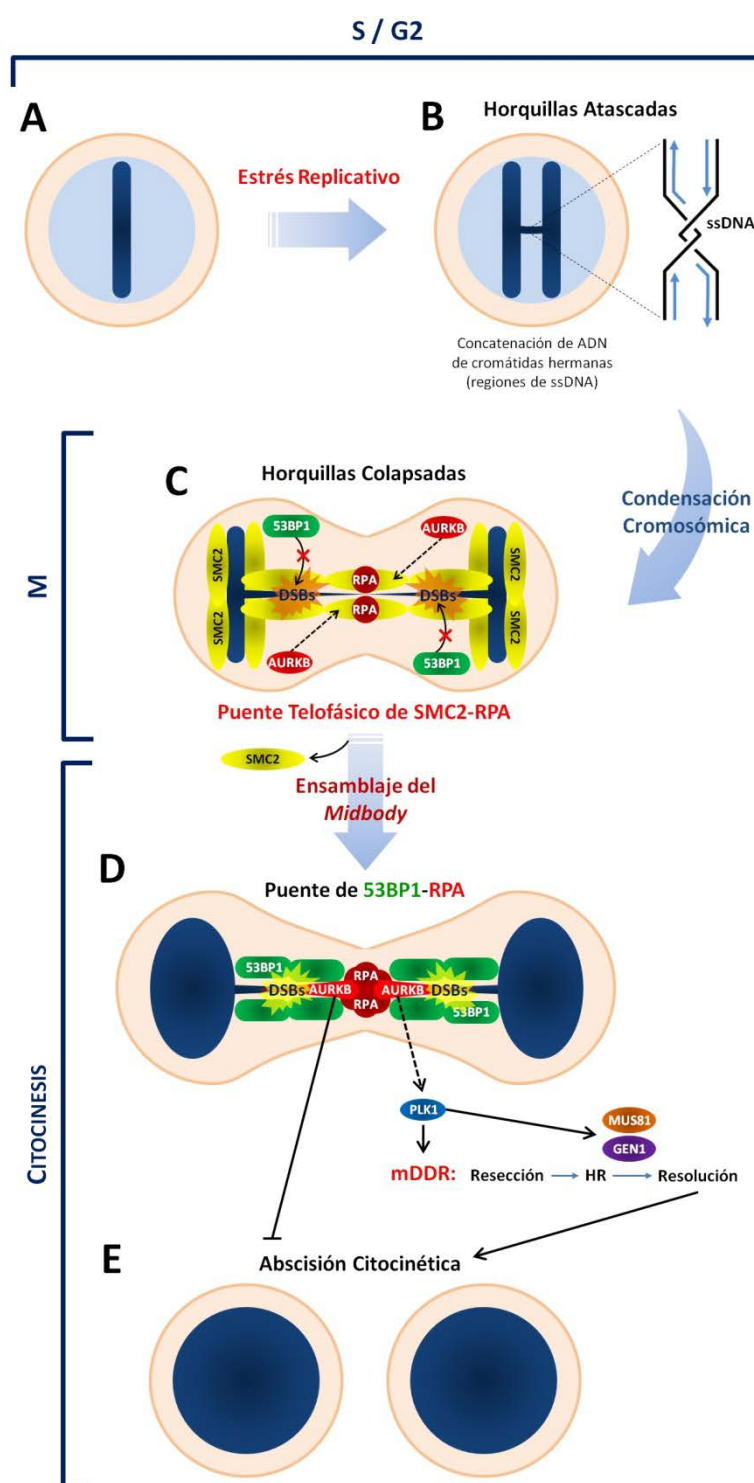
En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la mDDR asegura que la citocinesis sea correcta, pero para ello requiere que también lo sea la condensación cromosómica, ya que ésta permite una segregación cromosómica exitosa. Esto explica cómo los defectos en condensación cromosómica ocasionados por la depleción de las condensinas redundan en la generación de un mayor número de células binucleadas con la reducción concomitante en la formación del *midbody* y en la activación de la mDDR (formación de 53RBs). Acorde con nuestras observaciones, un trabajo reciente en embriones de *Caenorhabditis elegans* muestra que la presencia del complejo Condensina I (que contiene SMC2) en la zona media del huso mitótico y en el *midbody* previene los fallos en citocinesis inducidos por los puentes cromosómicos de forma dependiente de Aurora B (Bembenek *et al.*, 2013).

## 2.5. Modelo sobre el origen del *midbody* y de los 53RBs

En base a los resultados y observaciones fruto de nuestros estudios sobre las relaciones de la mDDR con la condensación cromosómica, podemos proponer un modelo que explique el origen del *midbody* y de los 53RBs en relación con ésta (Figura 84). La secuencia de acontecimientos tendría lugar del siguiente modo:

- a) En fase S/G2, la presencia de estrés replicativo (Figura 84A) genera horquillas de replicación atascadas, ricas en regiones de ssDNA en las cuales tiene lugar la concatenación de ADN de cromátidas hermanas (Figura 84B).
- b) En mitosis tiene lugar la condensación cromosómica, caracterizada por la hipercondensación del ADN en los cromosomas mitóticos y la unión de las condensinas (entre ellas, SMC2) a éstos. La condensación cromosómica genera fuerzas mecánicas que hacen que las horquillas atascadas pasen a colapsarse, generando DSBs. Sin embargo, la inactivación de la DDR secundaria que tiene lugar en mitosis impide que en este estadio 53BP1 se una a las DSBs. Sólo RPA es capaz de reconocer las regiones de ssDNA lesionadas, que sufren especialmente los efectos de la condensación cromosómica y generan puentes anafásicos. En telofase, la presencia de RPA y de la condensina SMC2 en la región dañada da lugar a la generación de los puentes telofásicos de SMC2-RPA. A su vez, SMC2 en la cromatina hipercondensada presente en la zona media del huso mitótico sirve de guía para el reclutamiento de Aurora B (Figura 84C).
- c) En citocinesis, la condensación cromosómica deja de ser efectiva, eliminándose la condensina SMC2 del ADN. El puente cromosómico se halla interconectando los dos núcleos hijos, con RPA unido a las regiones de ssDNA y Aurora B constituyendo el *midbody* sobre él. En el *midbody*, Aurora B, a través de PLK1, activa la mDDR. Esto permite que 53BP1 reconozca las DSBs generadas durante mitosis, dando lugar a las ramas de 53BP1 del 53RB. La mDDR activa también la reparación del puente cromosómico por

HR, con el paso previo de resección de las DSBs, lo que hace que se una aún más RPA a la zona central del 53RB. Paralelamente, Aurora B, ante la presencia del puente cromosómico, activa el *checkpoint* de abscisión citocinética, que impide que ésta tenga lugar mientras aquél no se haya resuelto. Por otro lado, PLK1, estimulada por Aurora B, activa en última instancia a las endonucleasas de resolución (resolvasas) mitóticas, MUS81 y GEN1 (Figura 84D).



**Figura 84 | Modelo sobre el origen del midbody y de los 53RBs.** (A) En fase S y G2 ciertas regiones del genoma, como los sitios frágiles, son especialmente vulnerables a los efectos del estrés replicativo. (B) En consecuencia, se genera ssDNA en las horquillas de replicación atascadas, que son zonas de replicación incompleta en las que además tiende a producirse concatenación de ADN entre cromátidas hermanas. (C) En mitosis, la condensación cromosómica, dada por la unión de los complejos condensina (de los que SMC2 forma parte esencial) al ADN, generaría tensiones mecánicas que causan el colapso de las horquillas de replicación, generándose DSBs en el puente cromosómico formado. Éstas aún no podrían ser reconocidas por 53BP1, inactivada mitóticamente. RPA sí reconocería la región de ssDNA, dando lugar en telofase a los puentes telofásicos de SMC2-RPA. Los restos de cromatina hipercondensada en éstos servirían de guías para el reclutamiento de Aurora B. (D) En citocinesis, ya en ausencia de condensación cromosómica por la eliminación de las condensinas del ADN, Aurora B dirige el ensamblaje del midbody. Desde éste, inhibe la abscisión citocinética en presencia del puente cromosómico, a través del *checkpoint* de abscisión citocinética. Adicionalmente, Aurora B, a través de PLK1 mediante una interacción hipotética no demostrada aún, activaría la mDDR. Ésta permitiría el reconocimiento de las DSBs generadas anteriormente por 53BP1, originándose los 53RBs junto a RPA unida al ssDNA. Además, posibilitaría la reparación por recombinación homóloga previa resección de las DSBs, lo que daría lugar a una mayor unión de RPA en los 53RBs. PLK1 también activaría a las endonucleasas de resolución mitóticas MUS81 y GEN1, encargadas de efectuar el último paso de la reparación, la resolución del puente cromosómico. (E) Cuando ésta tiene lugar, la abscisión citocinética se produciría sin problemas.



- d) Éstas posibilitan que se dé el último paso de la reparación por HR de los puentes cromosómicos, la resolución de las estructuras de Holliday dobles (dHJs) generadas en el proceso. Del mismo modo, las endonucleasas de resolución mitóticas son capaces de resolver también las estructuras intermedias de replicación y las concatenaciones del ADN del puente cromosómico. Una vez resuelto éste, puede producirse sin problemas la abscisión citocinética, separándose por completo las dos células hijas (Figura 84E).

### 3. Las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR

#### 3.1. Papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR

Como ya se ha indicado, se consideró que las endonucleasas de resolución (resolvasas) mitóticas MUS81 y GEN1 podrían desempeñar un papel destacado en la mDDR y en concreto en la resolución de los puentes cromosómicos que la disparan. Diversos factores contribuyeron a formular esta hipótesis:

- a) MUS81 y GEN1 están presentes en el *midbody*.
- b) Son enzimas específicas de reparación asociadas a los últimos pasos de la recombinación homóloga, la cual se da en los 53RBs.
- c) Son activadas por PLK1, kinasa que controla la mDDR y la citocinesis.
- d) Esta activación se produce en los últimos estadios de la división celular, justo cuando tiene lugar la citocinesis.

Las endonucleasas de resolución mitóticas se encargarían de llevar a cabo el “paso final” de la reparación de los puentes cromosómicos: Su resolución. MUS81 y GEN1 son endonucleasas específicas de estructura especializadas en la resolución de estructuras de Holliday dobles (dHJs). De por sí, serían capaces de resolver todo el puente cromosómico, que en última instancia se debe a estructuras de ADN intermediarias de la replicación como pueden ser las concatenaciones entre cromáticas hermanas. Pero, además, también resolverían las dHJs generadas en la HR que se da en los 53RBs.

En lo referente al vínculo de las endonucleasas de resolución mitóticas con los 53RBs, nuestros resultados indican que, al resolver las primeras estos puentes cromosómicos, su efecto sobre ellos es el de reducir su formación. Desde otro punto de vista, cuando los puentes cromosómicos son resueltos, cesa la activación de la mDDR y se aprecian menos 53RBs; y si la resolución no tiene lugar, la mDDR queda activada de forma “permanente” y se observan más 53RBs. La primera situación es la que tiene lugar con la concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* usando las



proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG, que además, en consecuencia, causa una disminución de la binucleación, llevándose mejor a cabo la citocinesis. La segunda situación se corresponde con los resultados obtenidos con el silenciamiento de las endonucleasas de resolución mitóticas, el cual conlleva un incremento concomitante en la binucleación, debido a los defectos en citocinesis asociados. En la mDDR, el papel de MUS81 y de GEN1 parece ser complementario y equivalente, ya que los efectos descritos de su concentración en el *midbody* se observaron con cada una de ellas de forma independiente y con resultados prácticamente idénticos.

En nuestros experimentos con ellas, llamó especialmente la atención el hecho de que la concentración artificial de MUS81 y GEN1 en el *midbody* mediante las proteínas quiméricas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG fuera capaz de rescatar la citocinesis normal en condiciones de inhibición de Aurora B o PLK1 desde anafase, ya que el efecto observado resultó especialmente drástico y nunca antes se habían obtenido resultados similares. Podríamos pensar que no se aprecia aumento en la binucleación porque no se dividen las células, aunque demostramos que el ciclo celular y la proliferación en las líneas celulares U2OS expresando ambas proteínas de fusión son normales en comparación con la línea control. Este resultado abre incluso la posibilidad de que pueda existir un *bypass* en la ruta de citocinesis, el cual permitiría que se diera la abscisión sin necesidad de la activación de Aurora B o de PLK1, y además sin el disparo de la mDDR. En estas condiciones, otro interrogante sería cómo se unen las proteínas 3xFLAG–MIT–MUS81 y GEN1–MIT–3xFLAG al *midbody* teniendo en cuenta que Aurora B y PLK1, las proteínas que controlan su formación, están inhibidas. La respuesta viene del hecho de que, aunque Aurora B y PLK1 están inhibidas, las proteínas quiméricas se dirigirían hacia el *midbody* en células donde el inicio de la citocinesis sí habría sido activado, paso dado justo antes de que se hiciera efectiva la inhibición “anafásica” de Aurora B y PLK1, ya que ésta no resulta perfecta en el tiempo (motivo por el cual los porcentajes de células binucleadas no son nunca del 100%, sino de  $\approx 25\%$  como mucho). Así, aunque Aurora B o PLK1 no estén presentes en el *midbody*, sí lo están el resto de sus componentes (complejo ESCRT-III, microtúbulos, tráfico vesicular, etc.), los cuales permiten el reclutamiento de las proteínas quiméricas a través de su dominio MIT fusionado artificialmente.

Como alternativa a la relación propuesta entre las endonucleasas de resolución mitóticas y los 53RBs, podría pensarse que éstos son originados por la actividad resolvasa de aquéllas cuando inducen los cortes en los puentes cromosómicos. A este respecto, hay que tener en cuenta que resulta cuestionable la idea de que 53BP1 se reclutara de forma tan permanente al corte producido por una endonucleasa de resolución, considerando además que las ligasas actuarían inmediatamente tras éste. Por otra parte, los resultados obtenidos experimentalmente con el *knock-down* de las endonucleasas de resolución mitóticas y con su concentración en el *midbody* contradicen esta hipótesis. Por ello, los 53RBs han de ser considerados como el resultado de la activación “permanente” de la mDDR sin que aún haya tenido lugar el paso final de resolución en la reparación del puente cromosómico.

### 3.2. Estudios previos sobre el papel de las endonucleasas de resolución en la DDR

El papel de resolución de los puentes cromosómicos que asignamos a las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR resulta totalmente novedoso, ya que ésta nunca ha sido descrita. Sin embargo, las endonucleasas de resolución mitóticas se describieron desde hace tiempo y se les han asignado distintos papeles en la DDR en general.

En total, la lista de endonucleasas de resolución incluye a MUS81–EME1, GEN1, SLX1(–SLX4), SLX4 (plataforma de andamiaje a la que se anclan todas las demás), XPF–ERCC1 e incluso RAD1 (del complejo 9-1-1, con actividad endonucleasa de ssDNA). Existe solapamiento entre las funciones de todas ellas. Por ejemplo, se ha demostrado que XPF y MUS81 desempeñan papeles esenciales pero solapantes en reparación del ADN por HR (Kikuchi *et al.*, 2013).

Las funciones conocidas de las endonucleasas de resolución en la DDR son las siguientes:

#### 1) Resolución de las dHJs originadas en la HR:

Las resolvasas posibilitan que se dé esta vía de reparación de las dHJs generadas en la HR, como alternativa a la vía de disolución por el complejo BTR (BLM–TOPO-III $\alpha$ –RMI1/2) (Ciccía y Elledge, 2010), la cual está activa a lo largo de todo el ciclo celular. Las principales resolvasas de dHJs son MUS81 y GEN1 (Matos *et al.*, 2011).

#### 2) Reparación del daño en el ADN originado en replicación:

En levaduras, las DSBs espontáneas generadas durante la replicación del ADN son reparadas por HR con la cromátida hermana por las endonucleasas de resolución MUS81, GEN1, SLX1, SLX4 y RAD1, funcionando todas ellas de forma independiente a excepción de SLX1 (Muñoz-Galván *et al.*, 2012). También en levaduras, MUS81 y GEN1 se han implicado en las reorganizaciones cromosómicas complejas mediadas por el mecanismo de replicación inducida por rotura (BIR) (Pardo y Aguilera, 2012).

#### 3) Expresión de sitios frágiles:

Recientemente, las endonucleasas de resolución se han vinculado con la expresión (rotura) de los sitios frágiles comunes. Los CFSs podrían sufrir rotura controlada por las resolvasas ERCC1 y MUS81–EME1 y por la helicasa de disolución BLM en mitosis. Gracias a ello sería posible el correcto mantenimiento de la integridad genómica y se evitaría la rotura cromosómica descontrolada (Naim *et al.*, 2013; Pellicoli y Muzi-Falconi, 2013; Ying *et al.*, 2013). Incluso, otro estudio propone que el estrés genotóxico inducido por los oncogenes se

debe al procesamiento mitótico por MUS81 de intermediarios de replicación inusuales (Neelsen *et al.*, 2013).

#### 4) **Mantenimiento telomérico:**

Las endonucleasas de resolución también desempeñan papeles en el mantenimiento de los telómeros. Las resolvasas de la plataforma SLX4 cooperan con la helicasa RTEL1 (reguladora de la elongación telomérica 1, *regulator of telomere elongation 1*) para resolver los bucles-T (*T-loops*) y los cuádruplex-G (G4), estructuras secundarias del ADN telomérico que han de ser desmanteladas para permitir la replicación telomérica eficiente. Sin RTEL1, se producen pérdidas teloméricas en forma de ADN circular, y en ausencia de SLX4 éstas no se dan pero se incrementa la fragilidad telomérica (Vannier *et al.*, 2012).

#### 5) **Vías de resolución meióticas adicionales:**

Además de las rutas de resolución en las que participan las resolvasas anteriormente enumeradas, en *S. cerevisiae* se ha identificado otra vía de resolución en meiosis a través de la helicasa Sgs1 (ortólogo de BLM), la exonucleasa Exo1 de la familia XPG y el complejo MutLγ (Mlh1–Mlh3) del MMR (Zakharyevich *et al.*, 2012).

### 3.3. **Regulación de las endonucleasas de resolución mitóticas**

#### ✓ **Regulación mitótica de MUS81 y GEN1:**

Esta regulación es la que atañe principalmente a la mDDR, ya que es un fenómeno íntimamente ligado al final de mitosis. MUS81 y GEN1 son las principales endonucleasas de resolución de dHJs. Por ello, ha de evitarse su actuación descontrolada para asegurar la integridad genómica. En este sentido, resulta crítico que ambas estén finamente reguladas. Se activan por fosforilación por PLK1 y de forma coordinada, únicamente en mitosis (Matos *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013). MUS81 se activa por fosforilación, en muchos casos de su cofactor EME1, y es activada desde final de G2 hasta que concluye la mitosis (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012). GEN1, cuya translocación nuclear es regulada por fosforilación, sólo se activa al final de mitosis (Matos *et al.*, 2011; Gallo-Fernández *et al.*, 2012).

#### ✓ **Regulación por daño en el ADN:**

Poco se conoce en cuanto a la regulación de las endonucleasas de resolución ante daño en el ADN. Se sabe que, en levadura de fisión, Mus81–Eme1 se activa por fosforilación de Eme1 por Cdc2 (ortólogo de CDK1 en *S. pombe*) y Rad3 (ATR) (Dehé *et al.*, 2013). En levadura de gemación, la

regulación temporal de Mus81–Eme1 asegura la supervivencia celular bajo condiciones de daño en el ADN, aunque su activación no se induce por daño en las horquillas de replicación (Saugar *et al.*, 2013).

### 3.4. Estudios futuros sobre el papel de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR

La implicación de las endonucleasas de resolución mitóticas en la mDDR parece ser un campo muy rico en el cual sólo hemos realizado unos pocos estudios, pero con resultados bastante prometedores. Sería necesario continuar los experimentos con las líneas celulares de concentración de endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* para entender más a fondo los efectos observados. Por una parte, podría optimizarse la cuantificación de la binucleación por microscopía de alto rendimiento (HTM), para la obtención de resultados más robustos de forma automatizada. Más interesante aún resultaría abordar el estudio del posible rescate de la viabilidad celular con inhibición de PLK1 o Aurora B. En condiciones normales, este tratamiento continuado, tras la binucleación, acaba dando lugar en poco tiempo a la muerte de las células en cultivo. En las líneas con concentración de endonucleasas de resolución en el *midbody* se soluciona el problema de la binucleación, pero una cuestión abierta es si además se incrementaría la viabilidad celular respecto a la línea control, lo cual podría abordarse mediante ensayos de supervivencia celular e incluso registrarse mediante la grabación de vídeos de las células en cultivo.

Otra opción sería explorar otras estrategias de sobreactivación de las endonucleasas de resolución mitóticas. Para este propósito, algunas posibilidades serían la obtención de un mutante fosfomimético de MUS81 en los sitios de fosforilación por PLK1 (teniendo en cuenta que la enzima actúa junto con su cofactor EME1) o la fusión del receptor de estrógenos (ER, *estrogen receptor*) a GEN1 en la proteína quimérica GEN1–ER para activar a voluntad su importación nuclear de forma inducible por tamoxifeno.

Por último, pero no menos interesante, se debería explorar la existencia de una posible ruta de citocinesis independiente de Aurora B y PLK1, mediante la cual la concentración de las endonucleasas de resolución mitóticas en el *midbody* parece *bypashear* la citocinesis. Previsiblemente, la identificación de los componentes de esta ruta podría abrir un nuevo abanico de posibilidades terapéuticas extrapolables al tratamiento de ciertos tumores.

## 4. Investigaciones futuras sobre la mDDR

El descubrimiento de la mDDR como nuevo mecanismo de reparación del ADN asociado a citocinesis abre las puertas a un nuevo universo de estudios y de búsqueda de aplicaciones biomédicas con finalidad terapéutica.

#### 4.1. Estudios *in vitro* de la mDDR

Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a la mDDR, debería abordarse el estudio de las rutas de señalización especialmente implicadas en ella, primero desde el punto de vista bioquímico. El objetivo sería explicar los mecanismos moleculares por los cuales la formación del *midbody* regula la mDDR, así como el ensamblaje de éste en relación con la presencia de daño en el ADN o cromatina mal segregada.

Una primera línea de experimentos abordaría la caracterización proteómica del *midbody* y su interactómica. Usando protocolos de aislamiento bioquímico de *midbodies*, sería posible llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación, tratando de verificar algunas de las interacciones proteicas que figuran en nuestras hipótesis, como es el caso de la activación de PLK1 por Aurora B. Igualmente, podrían hallarse nuevas interacciones proteicas entre estas kinasas mitóticas y proteínas de la DDR aplicando espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) a los complejos proteicos obtenidos por *pull-down* en co-inmunoprecipitación.

#### 4.2. Estudios *in vivo* de la mDDR

De forma complementaria a las aproximaciones bioquímicas, la obtención de vídeos *in vivo* con versiones de Aurora B, PLK1 y proteínas de la DDR involucradas en la mDDR etiquetadas fluorescentemente ayudaría sin duda a esclarecer los mecanismos espaciotemporales de actuación de todas ellas en este proceso.

Finalmente, para estudiar la relevancia de estos mecanismos a nivel de organismo *in vivo*, podría abordarse la generación de los modelos murinos pertinentes. Éstos permitirían estudiar las implicaciones fisiopatológicas de la pérdida o alteración de componentes clave de la mDDR, con especial énfasis en su posible impacto en tumorigénesis.

#### 4.3. Potencial terapéutico de la mDDR y aplicaciones biomédicas

La consolidación de nuestras investigaciones en torno a la mDDR permitiría asignar a este nuevo mecanismo posibles aplicaciones terapéuticas. Una aplicación biomédica esencial sería intentar usar nuestro modelo de la mDDR para descubrir nuevas interacciones de letalidad sintética entre genes de la DDR y de la citocinesis. Como posibles ejemplos estarían *BLM–AURKB*, *MMS21–PLK1*, *MUS81/GEN1–AURKB/PLK1*, etc. La explotación de estas interacciones podría sentar las bases para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.



# CONCLUSIONES







# CONCLUSIONES

- 1) Proponemos un nuevo modelo de formación de focos de 53BP1 según el cual la interacción de su dominio Tudor en tándem con la marca epigenética H4K20me<sub>2</sub> la mantiene constitutivamente unida a la cromatina, en un estado “preparado” para reclutarse a las DSBs cuando éstas se produzcan mediante otras interacciones diferentes.
- 2) La función del dominio Tudor en tándem de 53BP1 puede ser llevada a cabo por otros dominios de unión genérica a cromatina, funcionalmente equivalentes, que resultan intercambiables con él.
- 3) Los dominios de unión genérica a cromatina dirigen inespecíficamente a sus proteínas a ésta, para que ejerzan su función. Su papel en la DDR es asegurar que los procesos se lleven a cabo de forma eficiente y rápida.
- 4) Este modelo de unión genérica a cromatina es extensible a otras proteínas de la DDR, como describimos para MSH6 y su dominio PWWP en la reparación de apareamientos erróneos (MMR).
- 5) La región mínima formadora de focos (IRIF) de 53BP1 presenta capacidad de unión al ADN *in vitro*, estando implicada en esta interacción su dominio Tudor en tándem y mostrando preferencia por ADN bicatenario y estructuras “burbuja”.

- 6) Existe una DDR asociada a citocinesis, la DDR del *midbody* (mDDR), disparada ante la presencia de puentes cromosómicos entre dos células hijas en separación.
- 7) Los puentes de 53BP1-RPA (53RBs) son marcadores de la mDDR a tiempos tardíos y representan roturas de puentes cromosómicos y reparación por recombinación homóloga. En ellos, la intensidad de la señal de RPA depende de ATM y de CtIP, lo que indica que son DSBs en las que se está activando la resección.
- 8) La activación de la mDDR se incrementa por condiciones que inducen la formación de puentes cromosómicos, como el estrés replicativo o la depleción de la helicasa BLM.
- 9) La mDDR depende de las kinasas mitóticas Aurora B y PLK1. Al igual que la citocinesis, requiere de una correcta condensación cromosómica.
- 10) Las endonucleasas de resolución mitóticas (resolvasas) MUS81 y GEN1, que podrían ser activadas por Aurora B a través de PLK1, actúan en el paso final de la mDDR resolviendo los puentes cromosómicos, lo que permite que tenga lugar la abscisión citocinética con mantenimiento de la integridad genómica.



# **BIBLIOGRAFÍA**



# BIBLIOGRAFÍA

- Abraham RT (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**(17):2177-96.
- Acilan C, Potter DM, Saunders WS (2007). DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes Chromosomes Cancer* **46**(6):522-31.
- Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP (2011). The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* **18**(12):1345-50.
- Adams MM, Wang B, Xia Z, Morales JC, Lu X, Donehower LA, Bochar DA, Elledge SJ, Carpenter PB (2005). 53BP1 oligomerization is independent of its methylation by PRMT1. *Cell Cycle* **4**(12):1854-61.
- Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot FD, King RW, Elledge SJ (2012). A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response. *Nat Cell Biol* **14**(3):318-28.
- Agromayor M, Martin-Serrano J (2013). Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol* **23**(9):433-41.
- Akimitsu N, Adachi N, Hirai H, Hossain MS, Hamamoto H, Kobayashi M, Aratani Y, Koyama H, Sekimizu K (2003). Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells depleting the activity of DNA topoisomerase IIalpha. *Genes Cells* **8**(4):393-402.
- Aly A, Ganesan S (2011). BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* **3**(1):66-74.
- Andersen SL, Bergstralh DT, Kohl KP, LaRocque JR, Moore CB, Sekelsky J (2009). Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Mol Cell* **35**(1):128-35.
- Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**(3):1751-8.
- Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR (2008). HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**(7195):682-6.
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922):499-506.
- Balakrishnan L, Milavetz B (2010). Decoding the histone H4 lysine 20 methylation mark. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**(5):440-52.
- Barber LJ, Youds JL, Ward JD, McIlwraith MJ, O'Neil NJ, Petalcorin MI, Martin JS, Collis SJ, Cantor SB, Auclair M, Tissenbaum H, West SC, Rose AM, Boulton SJ (2008). RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell* **135**(2):261-71.
- Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10):792-804.
- Bartek J, Lukas J (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**(5):421-9.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**(7035):864-70.
- Bartkova J, Horejsí Z, Sehested M, Nesland JM, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Stucki M, Jackson S, Lukas J, Bartek J (2007). DNA damage response mediators MDC1 and 53BP1: constitutive activation and aberrant loss in breast and lung cancer, but not in testicular germ cell tumours. *Oncogene* **26**(53):7414-22.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**(7119):633-7.

- Bastos RN, Barr FA (2010). Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J Cell Biol* **191**(4):751-60.
- Beck DB, Burton A, Oda H, Ziegler-Birling C, Torres-Padilla ME, Reinberg D (2012). The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes Dev* **26**(23):2580-9.
- Behlke-Steinert S, Touat-Todeschini L, Skoufias DA, Margolis RL (2009). SMC5 and MMS21 are required for chromosome cohesion and mitotic progression. *Cell Cycle* **8**(14):2211-8.
- Bekker-Jensen S, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol* **173**(2):195-206.
- Bekker-Jensen S, Mailand N (2011). The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett* **585**(18):2914-9.
- Bekker-Jensen S, Rendtlew Danielsen J, Fugger K, Gromova I, Nerstedt A, Lukas C, Bartek J, Lukas J, Mailand N (2010). HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. *Nat Cell Biol* **12**(1):80-6; sup pp 1-12.
- Belver L, de Yébenes VG, Ramiro AR (2010). MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies. *Immunity* **33**(5):713-22.
- Bembenek JN, Verbrugghe KJ, Khanikar J, Csankovszki G, Chan RC (2013). Condensin and the spindle midzone prevent cytokinesis failure induced by chromatin bridges in *C. elegans* embryos. *Curr Biol* **23**(11):937-46.
- Benson FE, Stasiak A, West SC (1994). Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J* **13**(23):5764-71.
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J* **28**(21):3413-27.
- Boisvert FM, Rhie A, Richard S, Doherty AJ (2005). The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* **4**(12):1834-41.
- Bolderson E, Tomimatsu N, Richard DJ, Boucher D, Kumar R, Pandita TK, Burma S, Khanna KK (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **38**(6):1821-31.
- Bonner MK, Poole DS, Xu T, Sarkeshik A, Yates JR 3rd, Skop AR (2011). Mitotic spindle proteomics in Chinese hamster ovary cells. *PLoS One* **6**(5):e20489.
- Booher RN, Holman PS, Fattaey A (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* **272**(35):22300-6.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* **11**(1):68-76.
- Bothmer A, Robbiani DF, di Virgilio M, Bunting SF, Klein IA, Feldhahn N, Barlow J, Chen HT, Bosque D, Callén E, Nussenzweig A, Nussenzweig MC (2011). Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Mol Cell* **42**(3):319-29.
- Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**(7):1361-73.
- Bouwman P, Aly A, Escandell JM, Pieterse M, Bartkova J, van der Gulden H, Hiddingh S, Thanasoula M, Kulkarni A, Yang Q, Haffty BG, Tommiska J, Blomqvist C, Drapkin R, Adams DJ, Nevanlinna H, Bartek J, Tarsounas M, Ganesan S, Jonkers J (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat Struct Mol Biol* **17**(6):688-95.
- Bouzinba-Segard H, Guais A, Francastel C (2006). Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(23):8709-14.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**(7051):660-5.
- Brustel J, Tardat M, Kirsh O, Grimaud C, Julien E (2011). Coupling mitosis to DNA replication: the emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol* **21**(8):452-60.
- Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**(7035):913-7.

- Bunting SF, Callén E, Kozak ML, Kim JM, Wong N, López-Contreras AJ, Ludwig T, Baer R, Faryabi RB, Malhowski A, Chen HT, Fernandez-Capetillo O, D'Andrea A, Nussenzweig A (2012). BRCA1 functions independently of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell* **46**(2):125-35.
- Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* **141**(2):243-54.
- Busino L, Donzelli M, Chiesa M, Guardavaccaro D, Ganoth D, Dorrello NV, Herskho A, Pagano M, Draetta GF (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**(6962):87-91.
- Caldecott KW (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* **9**(8):619-31.
- Caldwell CM, Green RA, Kaplan KB (2007). APC mutations lead to cytokinetic failures in vitro and tetraploid genotypes in Min mice. *J Cell Biol* **178**(7):1109-20.
- Callén E, di Virgilio M, Kruhlak MJ, Nieto-Soler M, Wong N, Chen HT, Faryabi RB, Polato F, Santos M, Starnes LM, Wesemann DR, Lee JE, Tubbs A, Sleckman BP, Daniel JA, Ge K, Alt FW, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2013). 53BP1 mediates productive and mutagenic DNA repair through distinct phosphoprotein interactions. *Cell* **153**(6):1266-80.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**(5383):1677-9.
- Cao L, Xu X, Bunting SF, Liu J, Wang RH, Cao LL, Wu JJ, Peng TN, Chen J, Nussenzweig A, Deng CX, Finkel T (2009). A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol Cell* **35**(4):534-41.
- Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30):10541-6.
- Carlton JG, Caballe A, Agromayor M, Kloc M, Martin-Serrano J (2012). ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C. *Science* **336**(6078):220-5.
- Carlton JG, Martin-Serrano J (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**(5833):1908-12.
- Carmena M, Pinson X, Platani M, Salloum Z, Xu Z, Clark A, Macisaac F, Ogawa H, Eggert U, Glover DM, Archambault V, Earnshaw WC (2012). The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol* **10**(1):e1001250.
- Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, Qin XF, Besmer E, Kenter A, Rajewsky K, Nussenzweig MC (1998). Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* **17**(8):2404-11.
- Chai B, Huang J, Cairns BR, Laurent BC (2005). Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* **19**(14):1656-61.
- Chan KL, North PS, Hickson ID (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* **26**(14):3397-409.
- Chan KL, Palmai-Pallag T, Ying S, Hickson ID (2009). Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* **11**(6):753-60.
- Chapman JR, Barral P, Vannier JB, Borel V, Steger M, Tomas-Loba A, Sartori AA, Adams IR, Batista FD, Boulton SJ (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol Cell* **49**(5):858-71.
- Charier G, Couprie J, Alpha-Bazin B, Meyer V, Quéméneur E, Guérois R, Callebaut I, Gilquin B, Zinn-Justin S (2004). The Tudor tandem of 53BP1: a new structural motif involved in DNA and RG-rich peptide binding. *Structure* **12**(9):1551-62.
- Chen CT, Ettinger AW, Huttner WB, Doxsey SJ (2013). Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol* **23**(3):118-28.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**(7051):725-30.
- Chestukhin A, Pfeffer C, Milligan S, DeCaprio JA, Pellman D (2003). Processing, localization, and requirement of human separase for normal anaphase progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8):4574-9.
- Chin CF, Yeong FM (2010). Safeguarding entry into mitosis: the antepause checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**(1):22-32.



- Chiolo I, Minoda A, Colmenares SU, Polyzos A, Costes SV, Karpen GH (2011). Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* **144**(5):732-44.
- Chou DM, Adamson B, Dephore NE, Tan X, Nottke AC, Hurov KE, Gygi SP, Colaiácovo MP, Elledge SJ (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(43):18475-80.
- Ciccia A, Elledge SJ (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**(2):179-204.
- Ciccia A, McDonald N, West SC (2008). Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* **77**:259-87.
- Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L, Degross F (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol Biol Cell* **14**(9):3821-33.
- Cimprich KA, Cortez D (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(8):616-27.
- Cléry A, Blatter M, Allain FH (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* **18**(3):290-8.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**(7051):642.
- Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR (2005). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**(6):949-61.
- Connell JW, Lindon C, Luzio JP, Reid E (2009). Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* **10**(1):42-56.
- Corkery D, Thillainadesan G, Coughlan N, Mohan RD, Isovich M, Tini M, Torchia J (2011). Regulation of the BRCA1 gene by an SRC3/53BP1 complex. *BMC Biochem* **12**:50.
- Corpet A, Almouzni G (2009). A histone code for the DNA damage response in mammalian cells? *EMBO J* **28**(13):1828-30.
- Corsini L, Sattler M (2007). Tudor hooks up with DNA repair. *Nat Struct Mol Biol* **14**(2):98-9.
- Coster G, Hayouka Z, Argaman L, Strauss C, Friedler A, Brandeis M, Goldberg M (2007). The DNA damage response mediator MDC1 directly interacts with the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J Biol Chem* **282**(44):32053-64.
- Crasta K, Ganem NJ, Dagher R, Lantermann AB, Ivanova EV, Pan Y, Nezi L, Protopopov A, Chowdhury D, Pellman D (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* **482**(7383):53-8.
- d'Adda di Fagnaga F (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **8**(7):512-22.
- d'Adda di Fagnaga F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**(6963):194-8.
- d'Arpa P, Beardmore C, Liu LF (1990). Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons. *Cancer Res* **50**(21):6919-24.
- de Bont R, van Larebeke N (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**(3):169-85.
- de Wind N, Dekker M, Claij N, Jansen L, van Klink Y, Radman M, Riggins G, van der Valk M, van't Wout K, te Riele H (1999). HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nat Genet* **23**(3):359-62.
- Dehé PM, Coulon S, Scaglione S, Shanahan P, Takedachi A, Wohlschlegel JA, Yates JR 3rd, Llorente B, Russell P, Gaillard PH (2013). Regulation of Mus81-Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* **20**(5):598-603.
- di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**(21):2540-51.
- di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagnaga F (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**(7119):638-42.
- di Virgilio M, Callén E, Yamane A, Zhang W, Jankovic M, Gitlin AD, Feldhahn N, Resch W, Oliveira TY, Chait BT, Nussenzweig A, Casellas R, Robbiani DF, Nussenzweig MC (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science* **339**(6120):711-5.
- Difilippantonio S, Gapud E, Wong N, Huang CY, Mahowald G, Chen HT, Kruhlak MJ, Callén E, Livak F, Nussenzweig MC, Sleckman BP, Nussenzweig A (2008). 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination. *Nature* **456**(7221):529-33.

- Dimitrova N, Chen YC, Spector DL, de Lange T (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* **456**(7221):524-8.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20):9363-7.
- Dinant C, Luijsterburg MS, Höfer T, von Bornstaedt G, Vermeulen W, Houtsmuller AB, van Driel R (2009). Assembly of multiprotein complexes that control genome function. *J Cell Biol* **185**(1):21-6.
- Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J, Lukas J, Lukas C (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**(3):435-46.
- Donzelli M, Draetta GF (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**(7):671-7.
- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Côté J (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**(6):979-90.
- Downs JA, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**(7147):951-8.
- Du LL, Nakamura TM, Russell P (2006). Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes Dev* **20**(12):1583-96.
- Dubreuil V, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB, Wilsch-Bräuninger M (2007). Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* **176**(4):483-95.
- Dumaz N, Meek DW (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* **18**(24):7002-10.
- Eggert US, Mitchison TJ, Field CM (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem* **75**:543-66.
- Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12):4846-51.
- Errico A, Costanzo V (2010). Differences in the DNA replication of unicellular eukaryotes and metazoans: known unknowns. *EMBO Rep* **11**(4):270-8.
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**(7033):598-604.
- Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell* **49**(5):872-83.
- Ettinger AW, Wilsch-Bräuninger M, Marzesco AM, Bickle M, Lohmann A, Maliga Z, Karbanová J, Corbeil D, Hyman AA, Huttner WB (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat Commun* **2**:503.
- Facchino S, Abdouh M, Chatoo W, Bernier G (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci* **30**(30):10096-111.
- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**(7033):605-11.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**(7035):917-21.
- Fededa JP, Gerlich DW (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol* **14**(5):440-7.
- Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, Dong MQ, Ruse C, Yates JR 3rd, Russell P, Fuchs RP, McGowan CH, Gaillard PH (2009). Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases. *Cell* **138**(1):78-89.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**(1):125-32.
- Feng L, Fong KW, Wang J, Wang W, Chen J (2013). RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *J Biol Chem* **288**(16):11135-43.

- Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A (2004b). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med* **199**(12):1671-7.
- Fernandez-Capetillo O, Celeste A, Nussenzweig A (2003b). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* **2**(5):426-7.
- Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* **4**(12):993-7.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2004a). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9):959-67.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A (2003a). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**(4):497-508.
- Ferri F, Bouzinba-Segard H, Velasco G, Hubé F, Francastel C (2009). Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase. *Nucleic Acids Res* **37**(15):5071-80.
- FitzGerald J, Moureau S, Drogaris P, O'Connell E, Abshiru N, Verreault A, Thibault P, Grenon M, Lowndes NF (2011). Regulation of the DNA damage response and gene expression by the Dot1L histone methyltransferase and the 53Bp1 tumour suppressor. *PLoS One* **6**(2):e14714.
- FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF (2009). 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment. *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 4):897-904.
- Flaus A, Martin DM, Barton GJ, Owen-Hughes T (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* **34**(10):2887-905.
- Fodor BD, Kubicek S, Yonezawa M, O'Sullivan RJ, Sengupta R, Perez-Burgos L, Opravil S, Mechtler K, Schotta G, Jenuwein T (2006). Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* **20**(12):1557-62.
- Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escribano-Díaz C, Orthwein A, Leung CC, Huang H, Landry MC, Kitevski-LeBlanc J, Noordermeer SM, Sicheri F, Durocher D (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* **499**(7456):50-4.
- Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F (2012). Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature* **488**(7410):231-5.
- Fujiwara T, Bandi M, Nitta M, Ivanova EV, Bronson RT, Pellman D (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**(7061):1043-7.
- Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, Polo S, Miller KM, Jackson SP (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature* **462**(7275):935-9.
- Gallo-Fernández M, Saugar I, Ortiz-Bazán MÁ, Vázquez MV, Tercero JA (2012). Cell cycle-dependent regulation of the nuclease activity of Mus81-Eme1/Mms4. *Nucleic Acids Res* **40**(17):8325-35.
- Ganem NJ, Pellman D (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J Cell Biol* **199**(6):871-81.
- Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**(2):157-62.
- Gisselsson D, Pettersson L, Höglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N (2000). Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10):5357-62.
- Giunta S, Belotserkovskaya R, Jackson SP (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol* **190**(2):197-207.
- Goodarzi AA, Jeggo P, Lobrich M (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)* **9**(12):1273-82.
- Goodarzi AA, Kurka T, Jeggo PA (2011). KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol* **18**(7):831-9.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**(7035):907-13.
- Gottlieb TM, Jackson SP (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1):131-42.

- Grotsky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, Neumann MA, Yaddanapudi SC, Croke M, Martinez-Alonso M, Redwood AB, Ortega-Martinez S, Feng Z, Lerma E, Ramon y Cajal T, Zhang J, Matias-Guiu X, Dusso A, Gonzalo S (2013). BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. *J Cell Biol* **200**(2):187-202.
- Guizetti J, Gerlich DW (2010). Cytokinetic abscission in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* **21**(9):909-16.
- Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* **331**(6024):1616-20.
- Guse A, Mishima M, Glotzer M (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* **15**(8):778-86.
- Hadders MA, Agromayor M, Obita T, Perisic O, Caballe A, Kloc M, Lamers MH, Williams RL, Martin-Serrano J (2012). ESCRT-III binding protein MITD1 is involved in cytokinesis and has an unanticipated PLD fold that binds membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(43):17424-9.
- Hahn M, Dambacher S, Dulev S, Kuznetsova AY, Eck S, Wörz S, Sadic D, Schulte M, Mallm JP, Maiser A, Debs P, von Melchner H, Leonhardt H, Schermelleh L, Rohr K, Rippe K, Storchova Z, Schotta G (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev* **27**(8):859-72.
- Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **282**(22):16441-53.
- Hajdu I, Ciccio A, Lewis SM, Elledge SJ (2011). Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(32):13130-4.
- Hakem R (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* **27**(4):589-605.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274):458-60.
- Harper JW, Elledge SJ (2008). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**(5):739-45.
- Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**(4):387-400.
- Harrigan JA, Belotserkovskaya R, Coates J, Dimitrova DS, Polo SE, Bradshaw CR, Fraser P, Jackson SP (2011). Replication stress induces 53BP1-containing OPT domains in G1 cells. *J Cell Biol* **193**(1):97-108.
- Hartlerode AJ, Guan Y, Rajendran A, Ura K, Schotta G, Xie A, Shah JV, Scully R (2012). Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks. *PLoS One* **7**(11):e49211.
- Hartlerode AJ, Scully R (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* **423**(2):157-68.
- Hayashi MT, Karlseder J (2013). DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene* [ePub] doi: 10.1038/onc.2012.615.
- Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **37**:614-36.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**:585-621.
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**(6):639-48.
- Hendrix J, Gijsbers R, De Rijck J, Voet A, Hotta J, McNeely M, Hofkens J, Debyser Z, Engelborghs Y (2011). The transcriptional co-activator LEDGF/p75 displays a dynamic scan-and-lock mechanism for chromatin tethering. *Nucleic Acids Res* **39**(4):1310-25.
- Hiom K (2000). Homologous recombination. *Curr Biol* **10**(10):R359-61.
- Hirao A, Kong YY, Matsuo S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**(5459):1824-7.
- Hirata A, Klein BJ, Murakami KS (2008). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature* **451**(7180):851-4.
- Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**(6835):366-74.
- Hoeijmakers JH (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* **361**(15):1475-85.
- Horgan CP, Hanscom SR, Kelly EE, McCaffrey MW (2012). Tumor susceptibility gene 101 (TSG101) is a novel binding-partner for the class II Rab11-FIPs. *PLoS One* **7**(2):e32030.

- Hsiao KY, Mizzen CA (2013). Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J Mol Cell Biol* **5**(3):157-65.
- Hsu LC, White RL (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22):12983-8.
- Hu CK, Coughlin M, Mitchison TJ (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**(6):1024-34.
- Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**(5):901-14.
- Huen MS, Huang J, Leung JW, Sy SM, Leung KM, Ching YP, Tsao SW, Chen J (2010b). Regulation of chromatin architecture by the PWWP domain-containing DNA damage-responsive factor EXPAND1/MUM1. *Mol Cell* **37**(6):854-64.
- Huen MS, Sy SM, Chen J (2010a). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(2):138-48.
- Huen MS, Sy SM, van Deursen JM, Chen J (2008). Direct interaction between SET8 and proliferating cell nuclear antigen couples H4-K20 methylation with DNA replication. *J Biol Chem* **283**(17):11073-7.
- Huertas P, Jackson SP (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem* **284**(14):9558-65.
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**(7015):406-11.
- Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* **27**(20):7028-40.
- Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, Iseki S, Hara E, Masunaga T, Shimizu H, Nishimura EK (2009). Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. *Cell* **137**(6):1088-99.
- Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**(7220):357-61.
- Ismail IH, Hendzel MJ (2008). The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* **49**(1):73-82.
- Iwabuchi K, Bartel PL, Li B, Marraccino R, Fields S (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13):6098-102.
- Iwabuchi K, Basu BP, Kysela B, Kurihara T, Shibata M, Guan D, Cao Y, Hamada T, Imamura K, Jeggo PA, Date T, Doherty AJ (2003). Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. *J Biol Chem* **278**(38):36487-95.
- Jackson SP, Bartek J (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**(7267):1071-8.
- Jackson SP, Durocher D (2013). Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* **49**(5):795-807.
- Giunta S, Jackson SP (2011). Give me a break, but not in mitosis: the mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early signaling events. *Cell Cycle* **10**(8):1215-21.
- Jazayeri A, Balestrini A, Garner E, Haber JE, Costanzo V (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J* **27**(14):1953-62.
- Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* **293**(5532):1074-80.
- Jin J, Shirogane T, Xu L, Nalepa G, Qin J, Elledge SJ, Harper JW (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**(24):3062-74.
- Jiricny J (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(5):335-46.
- Jørgensen S, Elvers I, Trelle MB, Menzel T, Eskildsen M, Jensen ON, Helleday T, Helin K, Sørensen CS (2007). The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *J Cell Biol* **179**(7):1337-45.
- Jowsey P, Morrice NA, Hastie CJ, McLauchlan H, Toth R, Rouse J (2007). Characterisation of the sites of DNA damage-induced 53BP1 phosphorylation catalysed by ATM and ATR. *DNA Repair (Amst)* **6**(10):1536-44.
- Jullien D, Vagnarelli P, Earnshaw WC, Adachi Y (2002). Kinetochore localisation of the DNA damage response component 53BP1 during mitosis. *J Cell Sci* **115**(Pt 1):71-9.
- Kaidi A, Jackson SP (2013). KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature* **498**(7452):70-4.



- Kanaar R, Wyman C (2008). DNA repair by the MRN complex: break it to make it. *Cell* **135**(1):14-6.
- Kang Y, Lee JH, Hoan NN, Sohn HM, Chang IY, You HJ (2009). Protein phosphatase 5 regulates the function of 53BP1 after neocarzinostatin-induced DNA damage. *J Biol Chem* **284**(15):9845-53.
- Karagiannis TC, El-Osta A (2007). Chromatin modifications and DNA double-strand breaks: the current state of play. *Leukemia* **21**(2):195-200.
- Kass EM, Moynahan ME, Jasin M (2010). Loss of 53BP1 is a gain for BRCA1 mutant cells. *Cancer Cell* **17**(5):423-5.
- Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**(7015):316-23.
- Kemp MG, Akan Z, Yilmaz S, Grillo M, Smith-Roe SL, Kang TH, Cordeiro-Stone M, Kaufmann WK, Abraham RT, Sancar A, Unsal-Kaçmaz K (2010). Tipin-replication protein A interaction mediates Chk1 phosphorylation by ATR in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* **285**(22):16562-71.
- Kikuchi K, Narita T, Pham VT, Iijima J, Hirota K, Keka IS, Mohiuddin, Okawa K, Hori T, Fukagawa T, Essers J, Kanaar R, Whitby MC, Sugawara K, Taniguchi Y, Kitagawa K, Takeda S (2013). Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. *Cancer Res* **73**(14):4362-4371.
- Kitagawa R, Bakkenist CJ, McKinnon PJ, Kastan MB (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev* **18**(12):1423-38.
- Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM, Pelletier L, Jackson SP, Durocher D (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**(5856):1637-40.
- Koonin EV, Altschul SF, Bork P (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs... *Nat Genet* **13**(3):266-8.
- Korkhin Y, Unligil UM, Littlefield O, Nelson PJ, Stuart DI, Sigler PB, Bell SD, Abrescia NG (2009). Evolution of complex RNA polymerases: the complete archaeal RNA polymerase structure. *PLoS Biol* **7**(5):e1000102.
- Kornberg RD (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**(4139):868-71.
- Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4):693-705.
- Krämer A, Mailand N, Lukas C, Syljuåsen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, Bartek J, Lukas J (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* **6**(9):884-91.
- Krishnakumar R, Kraus WL (2010). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell* **39**(1):8-24.
- Kruhlak MJ, Celeste A, Dellaire G, Fernandez-Capetillo O, Müller WG, McNally JG, Bazett-Jones DP, Nussenzweig A (2006a). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **172**(6):823-34.
- Kruhlak MJ, Celeste A, Nussenzweig A (2006b). Spatio-temporal dynamics of chromatin containing DNA breaks. *Cell Cycle* **5**(17):1910-2.
- Kuo AJ, Song J, Cheung P, Ishibe-Murakami S, Yamazoe S, Chen JK, Patel DJ, Gozani O (2012). The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* **484**(7392):115-9.
- Kuo TC, Chen CT, Baron D, Onder TT, Loewer S, Almeida S, Weismann CM, Xu P, Houghton JM, Gao FB, Daley GQ, Duxson S (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol* **13**(10):1214-23.
- Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR 3rd, Abmayr SM, Washburn MP, Workman JL (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**(5704):2084-7.
- Lee H, Kwak HJ, Cho IT, Park SH, Lee CH (2009). S1219 residue of 53BP1 is phosphorylated by ATM kinase upon DNA damage and required for proper execution of DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun* **378**(1):32-6.
- Lee JH, Cheong HM, Kang MY, Kim SY, Kang Y (2009). Ser1778 of 53BP1 Plays a Role in DNA Double-strand Break Repairs. *Korean J Physiol Pharmacol* **13**(5):343-8.
- Lee JH, Paull TT (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**(5721):551-4.
- Lee S, Chang J, Renvoisé B, Tipirneni A, Yang S, Blackstone C (2012). MITD1 is recruited to midbodies by ESCRT-III and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**(22):4347-61.
- Letessier A, Millot GA, Koundrioukoff S, Lachagès AM, Vogt N, Hansen RS, Malfroy B, Brison O, Debatisse M (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. *Nature* **470**(7332):120-3.

- Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, Li GM (2013). The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . *Cell* **153**(3):590-600.
- Li L, Zou L (2005). Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J Cell Biochem* **94**(2):298-306.
- Lindahl T, Barnes DE (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**:127-33.
- Liu C, Wang D, Wu J, Keller J, Ma T, Yu X (2013). RNF168 forms a functional complex with RAD6 during the DNA damage response. *J Cell Sci* **126**(Pt9):2042-51.
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**(12):1448-59.
- Lo KW, Kan HM, Chan LN, Xu WG, Wang KP, Wu Z, Sheng M, Zhang M (2005). The 8-kDa dynein light chain binds to p53-binding protein 1 and mediates DNA damage-induced p53 nuclear accumulation. *J Biol Chem* **280**(9):8172-9.
- Lottersberger F, Bothmer A, Robbiani DF, Nussenzweig MC, de Lange T (2013). Role of 53BP1 oligomerization in regulating double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(6):2146-51.
- Lu R, Wang GG (2013). Tudor: a versatile family of histone methylation 'readers'. *Trends Biochem Sci* [ePub] doi:pii: S0968-0004(13)00133-3.10.1016/j.tibs.2013.08.002.
- Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**(3):255-60.
- Lukas C, Melander F, Stucki M, Falck J, Bekker-Jensen S, Goldberg M, Lerenthal Y, Jackson SP, Bartek J, Lukas J (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J* **23**(13):2674-83.
- Lukas C, Savic V, Bekker-Jensen S, Doil C, Neumann B, Pedersen RS, Grøfte M, Chan KL, Hickson ID, Bartek J, Lukas J (2011). 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress. *Nat Cell Biol* **13**(3):243-53.
- Lukas J, Bartek J (2008). DNA damage: a histone-code mediator leaves the stage. *Nat Struct Mol Biol* **15**(5):430-2.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9):997-1007.
- Lukas J, Lukas C, Bartek J (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol* **13**(10):1161-9.
- Mackay DR, Makise M, Ullman KS (2010). Defects in nuclear pore assembly lead to activation of an Aurora B-mediated abscission checkpoint. *J Cell Biol* **191**(5):923-31.
- Macrae CJ, McCulloch RD, Ylanko J, Durocher D, Koch CA (2008). APLF (C2orf13) facilitates nonhomologous end-joining and undergoes ATM-dependent hyperphosphorylation following ionizing radiation. *DNA Repair (Amst)* **7**(2):292-302.
- Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* **417**(3):639-50.
- Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**(5):887-900.
- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuåsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**(5470):1425-9.
- Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**(1):43-8.
- Mallette FA, Mattioli F, Cui G, Young LC, Hendzel MJ, Mer G, Sixma TK, Richard S (2012). RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* **31**(8):1865-78.
- Mallette FA, Richard S (2012). K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites. *Cell Res* **22**(8):1221-3.
- Manis JP, Morales JC, Xia Z, Kutok JL, Alt FW, Carpenter PB (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat Immunol* **5**(5):481-7.
- Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* **256**(1):291-9.



- Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, Huttner WB (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 13):2849-58.
- Maser RS, DePinho RA (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* **297**(5581):565-9.
- Matos J, Blanco MG, Maslen S, Skehel JM, West SC (2011). Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. *Cell* **147**(1):158-72.
- Matos J, Blanco MG, West SC (2013). Cell-cycle kinases coordinate the resolution of recombination intermediates with chromosome segregation. *Cell Rep* **4**(1):76-86.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**(5828):1160-6.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**(5395):1893-7.
- Matsusaka T, Pines J (2004). Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *J Cell Biol* **166**(4):507-16.
- Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP (2003). The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**(2):69-74.
- Méndez J, Stillman B (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**(22):8602-12.
- Mendoza M, Norden C, Durrer K, Rauter H, Uhlmann F, Barral Y (2009). A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**(4):477-83.
- Messner S, Altmeyer M, Zhao H, Pozivil A, Roschitzki B, Gehrig P, Rutishauser D, Huang D, Caflisch A, Hottiger MO (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res* **38**(19):6350-62.
- Mikhailov A, Cole RW, Rieder CL (2002). DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol* **12**(21):1797-806.
- Miyashita T, Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2):293-9.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**(5656):343-8.
- Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, Halazonetis TD (2003). 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res* **63**(24):8586-91.
- Moldovan GL, d'Andrea AD (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* **43**:223-49.
- Mondal G, Rowley M, Guidugli L, Wu J, Pankratz VS, Couch FJ (2012). BRCA2 localization to the midbody by filamin A regulates cep55 signaling and completion of cytokinesis. *Dev Cell* **23**(1):137-52.
- Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* **26**(19):4215-27.
- Morris JR, Boutell C, Keppler M, Densham R, Weekes D, Alamshah A, Butler L, Galanty Y, Pangon L, Kiuchi T, Ng T, Solomon E (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* **462**(7275):886-90.
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**(6):767-75.
- Morrow DM, Connelly C, Hieter P (1997). "Break copy" duplication: a model for chromosome fragment formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**(2):371-82.
- Mosbech A, Lukas C, Bekker-Jensen S, Mailand N (2013). The deubiquitylating enzyme USP44 counteracts the DNA double-strand break response mediated by the RNF8 and RNF168 ubiquitin ligases. *J Biol Chem* **288**(23):16579-87.
- Motycka TA, Bessho T, Post SM, Sung P, Tomkinson AE (2004). Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *J Biol Chem* **279**(14):13634-9.
- Moudry P, Lukas C, Macurek L, Hanzlikova H, Hodny Z, Lukas J, Bartek J (2012b). Ubiquitin-activating enzyme UBA1 is required for cellular response to DNA damage. *Cell Cycle* **11**(8):1573-82.

- Moudry P, Lukas C, Macurek L, Neumann B, Heriche JK, Pepperkok R, Ellenberg J, Hodny Z, Lukas J, Bartek J (2012a). Nucleoporin NUP153 guards genome integrity by promoting nuclear import of 53BP1. *Cell Death Differ* **19**(5):798-807.
- Muñoz IM, Hain K, Déclais AC, Gardiner M, Toh GW, Sanchez-Pulido L, Heuckmann JM, Toth R, Macartney T, Eppink B, Kanaar R, Ponting CP, Lilley DM, Rouse J (2009). Coordination of structure-specific nucleases by human SLX4/BTBD12 is required for DNA repair. *Mol Cell* **35**(1):116-27.
- Muñoz-Galván S, Tous C, Blanco MG, Schwartz EK, Ehmsen KT, West SC, Heyer WD, Aguilera A (2012). Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1-Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication-born double-strand breaks by sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* **32**(9):1592-603.
- Murga M, Jaco I, Fan Y, Soria R, Martinez-Pastor B, Cuadrado M, Yang SM, Blasco MA, Skoultchi AI, Fernandez-Capetillo O (2007). Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J Cell Biol* **178**(7):1101-8.
- Murga M, Bunting S, Montaña MF, Soria R, Mulero F, Cañamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O (2009). A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* **41**(8):891-8.
- Naim V, Wilhelm T, Debatisse M, Rosselli F (2013). ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. *Nat Cell Biol* **15**(8):1008-15.
- Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y, Bonner WM (2010). The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **9**(2):389-97.
- Nakano K, Vousden KH (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3):683-94.
- Narine KA, Keuling AM, Gombos R, Tron VA, Andrew SE, Young LC (2010). Defining the DNA mismatch repair-dependent apoptotic pathway in primary cells: evidence for p53-independence and involvement of centrosomal caspase 2. *DNA Repair (Amst)* **9**(2):161-8.
- Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6):703-16.
- Neef R, Klein UR, Kopajtich R, Barr FA (2006). Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis. *Curr Biol* **16**(3):301-7.
- Neelsen KJ, Zanini IM, Herrador R, Lopes M (2013). Oncogenes induce genotoxic stress by mitotic processing of unusual replication intermediates. *J Cell Biol* **200**(6):699-708.
- Nelson G, Buhmann M, von Zglinicki T (2009). DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. *Cell Cycle* **8**(20):3379-83.
- New JH, Sugiyama T, Zaitseva E, Kowalczykowski SC (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**(6665):407-10.
- Noon AT, Shibata A, Rief N, Löbrich M, Stewart GS, Jeggo PA, Goodarzi AA (2010). 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol* **12**(2):177-84.
- Norden C, Mendoza M, Dobbelaere J, Kotwaliwale CV, Biggins S, Barral Y (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell* **125**(1):85-98.
- Nospikel T (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* **66**(6):994-1009.
- Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* **382**(6591):551-5.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**:617-56.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468):1053-8.
- Oda H, Hübner MR, Beck DB, Vermeulen M, Hurwitz J, Spector DL, Reinberg D (2010). Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage. *Mol Cell* **40**(3):364-76.
- O'Driscoll M, Jeggo PA (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* **7**(1):45-54.
- Osborn AJ, Elledge SJ, Zou L (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* **12**(11):509-16.

- Pandita TK, Lieberman HB, Lim DS, Dhar S, Zheng W, Taya Y, Kastan MB (2000). Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* **19**(11):1386-91.
- Papamichos-Chronakis M, Krebs JE, Peterson CL (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* **20**(17):2437-49.
- Pardo B, Aguilera A (2012). Complex chromosomal rearrangements mediated by break-induced replication involve structure-selective endonucleases. *PLoS Genet* **8**(9):e1002979.
- Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A (2009). DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**(6):1039-56.
- Park JH, Park EJ, Lee HS, Kim SJ, Hur SK, Imbalzano AN, Kwon J (2006). Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction. *EMBO J* **25**(17):3986-97.
- Parker LL, Piwnicka-Worms H (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**(5078):1955-7.
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**(8):741-7.
- Paulsen RD, Cimprich KA (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* **6**(7):953-66.
- Paulsen RD, Soni DV, Wollman R, Hahn AT, Yee MC, Guan A, Hesley JA, Miller SC, Cromwell EF, Solow-Cordero DE, Meyer T, Cimprich KA (2009). A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability. *Mol Cell* **35**(2):228-39.
- Peddibhotla S, Lam MH, Gonzalez-Rimbau M, Rosen JM (2009). The DNA-damage effector checkpoint kinase 1 is essential for chromosome segregation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(13):5159-64.
- Pei H, Wu X, Liu T, Yu K, Jelinek DF, Lou Z (2013). The histone methyltransferase MMSET regulates class switch recombination. *J Immunol* **190**(2):756-63.
- Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z, Lou Z (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* **470**(7332):124-8.
- Pelliccioli A, Foiani M (2005). Signal transduction: how rad53 kinase is activated. *Curr Biol* **15**(18):R769-71.
- Pelliccioli A, Muzi-Falconi M (2013). A blooming resolvase at chromosomal fragile sites. *Nat Cell Biol* **15**(8):883-5.
- Perfettini JL, Nardacci R, Séror C, Raza SQ, Sepe S, Saïdi H, Brottes F, Amendola A, Subra F, Del Nonno F, Chessa L, D'Incecco A, Gougeon ML, Piacentini M, Kroemer G (2010). 53BP1 represses mitotic catastrophe in syncytia elicited by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ* **17**(5):811-20.
- Pesavento JJ, Yang H, Kelleher NL, Mizzen CA (2008). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Mol Cell Biol* **28**(1):468-86.
- Petronczki M, Glotzer M, Kraut N, Peters JM (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell* **12**(5):713-25.
- Petsalaki E, Akoumianaki T, Black EJ, Gillespie DA, Zachos G (2011). Phosphorylation at serine 331 is required for Aurora B activation. *J Cell Biol* **195**(3):449-66.
- Pines J, Rieder CL (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* **3**(1):E3-6.
- Plans V, Guerra-Rebollo M, Thomson TM (2008). Regulation of mitotic exit by the RNF8 ubiquitin ligase. *Oncogene* **27**(10):1355-65.
- Pollarolo G, Schulz JG, Munck S, Dotti CG (2011). Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat Neurosci* **14**(12):1525-33.
- Polo SE, Jackson SP (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* **25**(5):409-33.
- Polo SE, Kaidi A, Baskcomb L, Galanty Y, Jackson SP (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J* **29**(18):3130-9.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**(6):713-23.
- Ponting CP (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**(2):51-2.
- Poon RY (2007). Mitotic phosphorylation: breaking the balance of power by a tactical retreat. *Biochem J* **403**(2):e5-7.

- Potts PR, Porteus MH, Yu H (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J* **25**(14):3377-88.
- Potts PR, Yu H (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* **25**(16):7021-32.
- Poulsen M, Lukas C, Lukas J, Bekker-Jensen S, Mailand N (2012). Human RNF169 is a negative regulator of the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **197**(2):189-99.
- Pryde F, Khalili S, Robertson K, Selfridge J, Ritchie AM, Melton DW, Jullien D, Adachi Y (2005). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J Cell Sci* **118**(Pt 9):2043-55.
- Reini K, Uitto L, Perera D, Moens PB, Freire R, Syväoja JE (2004). TopBP1 localises to centrosomes in mitosis and to chromosome cores in meiosis. *Chromosoma* **112**(7):323-30.
- Ren J, Chu Y, Zhang Y, Li Y, Cai H, Zhang X, Zhao D, Li Z, Ma H, Li W, Wang H, Wang J, Chen Y, Gao YE, Xiao L, Liu R, Qian J, Liu Y, Shi X, Jiang SW (2013). Epigenetic interventions increase the radiation sensitivity of cancer cells. *Curr Pharm Des* [ePub].
- Rice JC, Nishioka K, Sarma K, Steward R, Reinberg D, Allis CD (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev* **16**(17):2225-30.
- Rieder CL, Cole RW (1998). Entry into mitosis in vertebrate somatic cells is guarded by a chromosome damage checkpoint that reverses the cell cycle when triggered during early but not late prophase. *J Cell Biol* **142**(4):1013-22.
- Rieder CL, Salmon ED (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* **8**(8):310-8.
- Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppé JP, Campeau E, Beauséjour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**(Pt 1):68-81.
- Rodríguez-Campos A, Azorín F (2007). RNA is an integral component of chromatin that contributes to its structural organization. *PLoS One* **2**(11):e1182.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**(5):905-16.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**(10):5858-68.
- Roy S, Musselman CA, Kachirskaja I, Hayashi R, Glass KC, Nix JC, Gozani O, Appella E, Kutateladze TG (2010). Structural insight into p53 recognition by the 53BP1 tandem Tudor domain. *J Mol Biol* **398**(4):489-96.
- Rubbi CP, Milner J (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* **22**(4):975-86.
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10):798-812.
- Ruffner H, Verma IM (1997). BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14):7138-43.
- Ruzankina Y, Asare A, Brown EJ (2008). Replicative stress, stem cells and aging. *Mech Ageing Dev* **129**(7-8):460-6.
- Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G, Zediak VP, Velez M, Bhandoola A, Brown EJ (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* **1**(1):113-26.
- Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestøl K, Poulton J, Rusten TE, Skotheim RI, Raiborg C, Stenmark H (2010). PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol* **12**(4):362-71.
- Sale JE (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(3):a012708.
- Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bähler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**(5):603-14.
- Santos MA, Huen MS, Jankovic M, Chen HT, López-Contreras AJ, Klein IA, Wong N, Barbancho JL, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig MC, Chen J, Nussenzweig A (2010). Class switching and meiotic defects in mice lacking the E3 ubiquitin ligase RNF8. *J Exp Med* **207**(5):973-81.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**(7169):509-14.
- Saugar I, Vázquez MV, Gallo-Fernández M, Ortiz-Bazán MA, Segurado M, Calzada A, Tercero JA (2013). Temporal regulation of the Mus81-Mms4 endonuclease ensures cell survival under conditions of DNA damage. *Nucleic Acids Res* [ePub].

- Schiell JA, Simon GC, Zaharris C, Weisz J, Castle D, Wu CC, Prekeris R (2012). FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nat Cell Biol* **14**(10):1068-78.
- Schotta G, Sengupta R, Kubicek S, Malin S, Kauer M, Callén E, Celeste A, Pagani M, Opravil S, De La Rosa-Velazquez IA, Espejo A, Bedford MT, Nussenzweig A, Busslinger M, Jenuwein T (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev* **22**(15):2048-61.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **151**(7):1381-90.
- Sedgwick B, Bates PA, Paik J, Jacobs SC, Lindahl T (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair (Amst)* **6**(4):429-42.
- Sengupta S, Robles AI, Linke SP, Sinogeeva NI, Zhang R, Pedoux R, Ward IM, Celeste A, Nussenzweig A, Chen J, Halazonetis TD, Harris CC (2004). Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J Cell Biol* **166**(6):801-13.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**(5):593-602.
- Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* **141**(6):970-81.
- Sharpless NE, DePinho RA (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9):703-13.
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**(6795):541-4.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12):1501-12.
- Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**(3):289-300.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**(3):325-34.
- Shiloh Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3):155-68.
- Shim EY, Hong SJ, Oum JH, Yanez Y, Zhang Y, Lee SE (2007). RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Mol Cell Biol* **27**(5):1602-13.
- Shim EY, Ma JL, Oum JH, Yanez Y, Lee SE (2005). The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **25**(10):3934-44.
- Shiromizu T, Goto H, Tomono Y, Bartek J, Totsukawa G, Inoko A, Nakanishi M, Matsumura F, Inagaki M (2006). Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells* **11**(5):477-85.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**(5762):844-7.
- Skop AR, Liu H, Yates J 3rd, Meyer BJ, Heald R (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* **305**(5680):61-6.
- Smith JR, Pereira-Smith OM (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* **273**(5271):63-7.
- Smits VA, Reaper PM, Jackson SP (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* **16**(2):150-9.
- Squatrino M, Vanoli F, Schultz N, Jasin M, Holland EC (2012). 53BP1 is a haploinsufficient tumor suppressor and protects cells from radiation response in glioma. *Cancer Res* **72**(20):5250-60.
- Stauffer DR, Howard TL, Nyun T, Hollenberg SM (2001). CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. *J Cell Sci* **114**(Pt 13):2383-93.
- Steigemann P, Gerlich DW (2009). Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol* **19**(11):606-16.
- Steigemann P, Wurzenberger C, Schmitz MH, Held M, Guizetti J, Maar S, Gerlich DW (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* **136**(3):473-84.
- Stewart GS (2012). The demise of a TUDOR under stress opens a chromatin link to 53BP1. *EMBO J* **31**(8):1847-9.



- Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* **136**(3):420-34.
- Stewenius Y, Gorunova L, Jonson T, Larsson N, Höglund M, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F, Gisselsson D (2005). Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15):5541-6.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**(7):1213-26.
- Stucki M, Jackson SP (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* **5**(5):534-43.
- Sundin O, Varshavsky A (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* **21**(1):103-14.
- Svendsen JM, Smogorzewska A, Sowa ME, O'Connell BC, Gygi SP, Elledge SJ, Harper JW (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. *Cell* **138**(1):63-77.
- Takahashi K, Kaneko I (1985). Changes in nuclease sensitivity of mammalian cells after irradiation with 60Co gamma-rays. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **48**(3):389-95.
- Takahashi N, Kobayashi S, Jiang X, Kitagori K, Imai K, Hibi Y, Okamoto T (2004). Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* **315**(2):434-8.
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**(17):1549-56.
- Takaki T, Trenz K, Costanzo V, Petronczki M (2008). Polo-like kinase 1 reaches beyond mitosis--cytokinesis, DNA damage response, and development. *Curr Opin Cell Biol* **20**(6):650-60.
- Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* **20**(3):317-25.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**(11):1025-40.
- Taylor WR, Stark GR (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**(15):1803-15.
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**(6):1876-83.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **13**(2):152-7.
- Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, Sacher M, Eckert-Boulet N, Reid R, Jentsch S, Rothstein R, Aragón L, Lisby M (2007). The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* **9**(8):923-31.
- Townsend K, Mason H, Blackford AN, Miller ES, Chapman JR, Sedgwick GG, Barone G, Turnell AS, Stewart GS (2009). Mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1) regulates mitotic progression. *J Biol Chem* **284**(49):33939-48.
- Trenz K, Errico A, Costanzo V (2008). Plx1 is required for chromosomal DNA replication under stressful conditions. *EMBO J* **27**(6):876-85.
- Tripathi V, Kaur S, Sengupta S (2008). Phosphorylation-dependent interactions of BLM and 53BP1 are required for their anti-recombinogenic roles during homologous recombination. *Carcinogenesis* **29**(1):52-61.
- Tripathi V, Nagarjuna T, Sengupta S (2007). BLM helicase-dependent and -independent roles of 53BP1 during replication stress-mediated homologous recombination. *J Cell Biol* **178**(1):9-14.
- Tritarelli A, Oricchio E, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Lavia P, Soddu S, Cundari E (2004). p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **15**(8):3751-7.
- Trojer P, Li G, Sims RJ 3rd, Vaquero A, Kalakonda N, Bocconi P, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nimer SD, Wang YH, Reinberg D (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* **129**(5):915-28.
- Tsukuda T, Fleming AB, Nickoloff JA, Osley MA (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **438**(7066):379-83.
- Tsvetkov L, Xu X, Li J, Stern DF (2003). Polo-like kinase 1 and Chk2 interact and co-localize to centrosomes and the midbody. *J Biol Chem* **278**(10):8468-75.

- Turner BM (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**(9):836-45.
- Tuttle RL, Bothos J, Summers MK, Luca FC, Halazonetis TD (2007). Defective in mitotic arrest 1/ring finger 8 is a checkpoint protein that antagonizes the human mitotic exit network. *Mol Cancer Res* **5**(12):1304-11.
- Uetake Y, Sluder G (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol* **165**(5):609-15.
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**(6):777-88.
- van Attikum H, Gasser SM (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(10):757-65.
- van Attikum H, Gasser SM (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* **19**(5):207-17.
- van Vugt MA, Gardino AK, Linding R, Ostheimer GJ, Reinhardt HC, Ong SE, Tan CS, Miao H, Keezer SM, Li J, Pawson T, Lewis TA, Carr SA, Smerdon SJ, Brummelkamp TR, Yaffe MB (2010). A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol* **8**(1):e1000287.
- Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MI, Ding H, Boulton SJ (2012). RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell* **149**(4):795-806.
- Vo AT, Zhu F, Wu X, Yuan F, Gao Y, Gu L, Li GM, Lee TH, Her C (2005). hMRE11 deficiency leads to microsatellite instability and defective DNA mismatch repair. *EMBO Rep* **6**(5):438-44.
- Voelkel-Meiman K, Roeder GS (1990). Gene conversion tracts stimulated by HOT1-promoted transcription are long and continuous. *Genetics* **126**(4):851-67.
- Wang B, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* **298**(5597):1435-8.
- Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* **34**(21):6170-82.
- Wang Y, Reddy B, Thompson J, Wang H, Noma K, Yates JR 3rd, Jia S (2009). Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein. *Mol Cell* **33**(4):428-37.
- Ward I, Kim JE, Minn K, Chini CC, Mer G, Chen J (2006). The tandem BRCT domain of 53BP1 is not required for its repair function. *J Biol Chem* **281**(50):38472-7.
- Ward IM, Difilippantonio S, Minn K, Mueller MD, Molina JR, Yu X, Frisk CS, Ried T, Nussenzweig A, Chen J (2005). 53BP1 cooperates with p53 and functions as a haploinsufficient tumor suppressor in mice. *Mol Cell Biol* **25**(22):10079-86.
- Ward IM, Minn K, van Deursen J, Chen J (2003). p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Mol Cell Biol* **23**(7):2556-63.
- Ward IM, Reina-San-Martin B, Olaru A, Minn K, Tamada K, Lau JS, Cascalho M, Chen L, Nussenzweig A, Livak F, Nussenzweig MC, Chen J (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *J Cell Biol* **165**(4):459-64.
- Wei W, Ba Z, Gao M, Wu Y, Ma Y, Amiard S, White CI, Rendtlew Danielsen JM, Yang YG, Qi Y (2012). A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* **149**(1):101-12.
- Welsh PL, Owens KN, King MC (2000). Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* **16**(2):69-74.
- West SC (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6):435-45.
- Wilcock AC, Swedlow JR, Storey KG (2007). Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development* **134**(10):1943-54.
- Williams RS, Moncalian G, Williams JS, Yamada Y, Limbo O, Shin DS, Grocock LM, Cahill D, Hitomi C, Guenther G, Moiani D, Carney JP, Russell P, Tainer JA (2008). Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* **135**(1):97-109.
- Williams RS, Williams JS, Tainer JA (2007). Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochem Cell Biol* **85**(4):509-20.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**(5813):856-9.
- Wilson KA, Stern DF (2008). NFB1/MDC1, 53BP1 and BRCA1 have both redundant and unique roles in the ATM pathway. *Cell Cycle* **7**(22):3584-94.



- Wu J, Prindle MJ, Dressler GR, Yu X (2009). PTIP regulates 53BP1 and SMC1 at the DNA damage sites. *J Biol Chem* **284**(27):18078-84.
- Wu L, Hickson ID (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**(6968):870-4.
- Xia Z, Morales JC, Dunphy WG, Carpenter PB (2001). Negative cell cycle regulation and DNA damage-inducible phosphorylation of the BRCT protein 53BP1. *J Biol Chem* **276**(4):2708-18.
- Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **278**(24):21767-73.
- Xie A, Hartlerode A, Stucki M, Odate S, Puget N, Kwok A, Nagaraju G, Yan C, Alt FW, Chen J, Jackson SP, Scully R (2007). Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Mol Cell* **28**(6):1045-57.
- Yang C, Tang X, Guo X, Niikura Y, Kitagawa K, Cui K, Wong ST, Fu L, Xu B (2011). Aurora-B mediated ATM serine 1403 phosphorylation is required for mitotic ATM activation and the spindle checkpoint. *Mol Cell* **44**(4):597-608.
- Yang D, Rismanchi N, Renvoisé B, Lippincott-Schwartz J, Blackstone C, Hurley JH (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat Struct Mol Biol* **15**(12):1278-86.
- Yang G, Scherer SJ, Shell SS, Yang K, Kim M, Lipkin M, Kucherlapati R, Kolodner RD, Edelmann W (2004). Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell* **6**(2):139-50.
- Yang H, Pesavento JJ, Starnes TW, Cryderman DE, Wallrath LL, Kelleher NL, Mizzen CA (2008). Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. *J Biol Chem* **283**(18):12085-92.
- Yasui Y, Urano T, Kawajiri A, Nagata K, Tatsuka M, Saya H, Furukawa K, Takahashi T, Izawa I, Inagaki M (2004). Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem* **279**(13):12997-3003.
- Ying S, Minocherhomji S, Chan KL, Palmai-Pallag T, Chu WK, Wass T, Mankouri HW, Liu Y, Hickson ID (2013). MUS81 promotes common fragile site expression. *Nat Cell Biol* **15**(8):1001-7.
- You Z, Bailis JM (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol* **20**(7):402-9.
- Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* **59**(15):3547-51.
- Yun MH, Hiom K (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* **459**(7245):460-3.
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC, Gillespie DA (2007). Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell* **12**(2):247-60.
- Zakharyevich K, Tang S, Ma Y, Hunter N (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell* **149**(2):334-47.
- Zgheib O, Pataky K, Brugger J, Halazonetis TD (2009). An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **29**(4):1050-8.
- Zhang D, Zaugg K, Mak TW, Elledge SJ (2006). A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell* **126**(3):529-42.
- Zhang S, Hemmerich P, Grosse F (2007). Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem* **101**(2):451-65.
- Zhao H, Piwnicka-Worms H (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**(13):4129-39.
- Zhou BB, Elledge SJ (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**(6811):433-9.
- Zimmermann M, Lottersberger F, Buonomo SB, Sfeir A, de Lange T (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science* **339**(6120):700-4.
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* **8**(8):870-6.
- Zou J, Rezvani K, Wang H, Lee KS, Zhang D (2013). BRCA1 downregulates the kinase activity of Polo-like kinase 1 in response to replication stress. *Cell Cycle* **12**(14) [ePub].

Zou L, Elledge SJ (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**(5625):1542-8.



## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

'	Minuto(s)
%	Porcentaje de
(ACS)-M	(Ausencia de segregación cromosómica)-mitosis ( <i>(absence of chromosome segregation)-mitosis</i> )
°C	Grado(s) centígrado(s)
3D	Tridimensional
3xAT- <i>Hook</i>	3 dominios AT- <i>Hook</i> en tándem
3xMBT	3 dominios MBT en tándem
3xMBT-ZnF	Dominio 3xMBT-ZnF
3xMBT-ZnF <sup>L3MBTL1</sup>	Dominio 3xMBT-ZnF de L3MBTL1
53BP1	Proteína de unión a p53 1 ( <i>p53-binding protein 1</i> )
53BP1-OPT	53BP1-Oct-1, PTF, transcripción
53BP1 NB	Cuerpo nuclear de 53BP1 ( <i>53BP1 nuclear body</i> )
53BP2	Proteína de unión a p53 2 ( <i>p53-binding protein 2</i> )
53DB	53BP1 ΔBRCTs
53RB	Puente de 53BP1-RPA ( <i>53BP1-RPA bridge</i> )
9-1-1	RAD9-RAD1-HUS1
A	Alanina (Ala)
A (base)	Adenina
Å	Ángstrom(s)
aa	Aminoácido
ac	Acetilación
ACA	Anticuerpo anti-centrómeros ( <i>anti-centromere antibody</i> )
ACS	Ausencia de segregación cromosómica ( <i>absence of chromosome segregation</i> )
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
ADP	Adenosín-difosfato
alt-NHEJ	NHEJ alternativo ( <i>alternative NHEJ</i> )
AP	Abásico (apurínico o apirimidínico)
APC	Aloficocianina ( <i>allophycocyanin</i> )
Apc	Proteína de la poliposis cólica adenomatosa ( <i>adenomatous polyposis coli</i> )
APC/C	Complejo promotor de anafase/ciclosoma ( <i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i> )
APH	Afidicolina ( <i>aphidicolin</i> )

<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNr</b>	ARN ribosómico
<b>ARNt</b>	ARN transferente
<b>ATM</b>	Mutada en ataxia-telangiectasia ( <i>ataxia-telangiectasia mutated</i> )
<b>ATMi</b>	Inhibidor(es) de ATM ( <i>ATM inhibitor(s)</i> )
<b>ATP</b>	Adenosín-trifosfato
<b>ATR</b>	Relacionada con ATM y Rad3 ( <i>ATM- and Rad3-related</i> )
<b>ATRi</b>	Inhibidor(es) de ATR ( <i>ATR inhibitor(s)</i> )
<b>AURKB</b>	Aurora B (kinasa Aurora B) ( <i>Aurora kinase B</i> )
<b>AURKBi</b>	Inhibidor(es) de AURKB ( <i>AURKB inhibitor(s)</i> )
<b>BAH</b>	Homología con adyacente a Bromo ( <i>Bromo-adjacent homology</i> )
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases ( <i>base excision repair</i> )
<b>BF</b>	Campo claro ( <i>bright field</i> )
<b>BIR</b>	Replicación inducida por rotura ( <i>break-induced replication</i> )
<b>BLAST</b>	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos ( <i>basic local alignment search tool</i> )
<b>BLM</b>	Bloom (síndrome de Bloom)
<b>BNP</b>	2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol ( <i>2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol</i> ) (bronopol)
<b>BR</b>	Reactivo de bloqueo ( <i>blocking reagent</i> )
<b>BRCA1</b>	Cáncer de mama 1 ( <i>breast cancer 1</i> )
<b>BRCA1-C</b>	BRCA1-CtIP
<b>BRCA2</b>	Cáncer de mama 2 ( <i>breast cancer 2</i> )
<b>BRCT</b>	Carboxi-terminal de cáncer de mama ( <i>breast cancer carboxy-terminal</i> )
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-desoxiuridina ( <i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> )
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina ( <i>bovine seroalbumin</i> )
<b>BTR</b>	BLM-TOPO-III $\alpha$ -RMI1/2
<b>C</b>	Cisteína (Cys)
<b>C (base)</b>	Citosina
<b>c-NHEJ</b>	NHEJ clásico ( <i>classical NHEJ</i> )
<b>CCD</b>	Dispositivo acoplado por carga ( <i>charge-coupled device</i> )
<b>CDC</b>	Ciclo de división celular ( <i>cell division cycle</i> )
<b>CDK</b>	Kinasa dependiente de ciclina ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
<b>cDNA</b>	ADN complementario ( <i>complementary DNA</i> )
<b>CDS</b>	Secuencia codificante ( <i>coding sequence</i> )
<b>cenFISH</b>	FISH centromérico ( <i>centromere FISH</i> )
<b>CEP55</b>	Proteína centrosomal de 55 KDa ( <i>centrosomal protein of 55 kDa</i> )

---

<b>CFS</b>	Sitio frágil común ( <i>common fragile site</i> )
<b>CHD</b>	Helicasa con cromodominio de unión a ADN ( <i>chromodomain-helicase DNA-binding</i> )
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina ( <i>chromatin immunoprecipitation</i> )
<b>ChIP-seq</b>	ChIP-secuenciación ( <i>ChIP-sequencing</i> )
<b>CHK1</b>	Kinasa de <i>checkpoint</i> 1 ( <i>checkpoint kinase 1</i> )
<b>CHK1i</b>	Inhibidor(es) de CHK1 ( <i>CHK1 inhibitor(s)</i> )
<b>CHK2</b>	Kinasa de <i>checkpoint</i> 2 ( <i>checkpoint kinase 2</i> )
<b>CHMP</b>	Proteína del cuerpo multivesicular cargado ( <i>charged multivesicular body protein</i> )
<b>cis-Pt</b>	Cisplatino [ <i>cis</i> -diaminodicloroplatino (II)] ( <i>cisplatin</i> )
<b>CPC</b>	Complejo pasajero cromosómico ( <i>chromosomal passenger complex</i> )
<b>cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>CSK-I</b>	Tampón de citoesqueleto-I ( <i>cytoskeleton-I buffer</i> )
<b>CSR</b>	Recombinación de cambio de clase ( <i>class-switch recombination</i> )
<b>C<sub>t</sub></b>	Carboxi-terminal (C-terminal)
<b>CtIP</b>	Proteína de interacción con CtBP ( <i>CtBP-interacting protein</i> )
<b>CTRL</b>	Control
<b>D</b>	Ácido aspártico (aspartato) (Asp)
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol ( <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> )
<b>DBD</b>	Dominio de unión al ADN ( <i>DNA-binding domain</i> )
<b>DDR</b>	Respuesta al daño en el ADN ( <i>DNA damage response</i> )
<b>DDRNA</b>	ARN de la DDR ( <i>DDR RNA</i> )
<b>Δ</b>	Deleción
<b>dHJ</b>	Estructura de Holliday doble ( <i>double Holliday junction</i> )
<b>diRNA</b>	ARN pequeño inducido por DSBs ( <i>DSB-induced small RNA</i> )
<b>DKO</b>	Doble <i>knock-out</i> ( <i>double knock-out</i> )
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ( <i>dimethyl-sulfoxide</i> )
<b>dn</b>	Doble nulo ( <i>double-null</i> )
<b>DNA-PKcs</b>	Subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de ADN ( <i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i> )
<b>DNA-SCARS</b>	Segmentos de ADN con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia ( <i>DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i> )
<b>DNMT3B1</b>	ADN metiltransferasa 3B1 ( <i>DNA methyltransferase 3B1</i> )
<b>DOT1L</b>	Similar al disruptor de la elongación telomérica 1 ( <i>disruptor of telomere silencing 1-like</i> )
<b>DSB</b>	Rotura de doble cadena ( <i>double-strand break</i> )
<b>DSBR</b>	Reparación de DSBs ( <i>DSB repair</i> )
<b>dsDNA</b>	ADN de doble cadena ( <i>double-stranded DNA</i> )

---

<b>dT</b>	Desoxitimina ( <i>deoxythymine</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol ( <i>dithiothreitol</i> )
<b>DUB</b>	Enzima desubiquitinizante ( <i>deubiquitylating enzyme</i> )
<b>E</b>	Ácido glutámico (glutamato) (Glu)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EdU</b>	5-etinil-2'-desoxiuridina ( <i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i> )
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético ( <i>ethylene-glycol-tetraacetic acid</i> )
<b>EM</b>	Microscopía electrónica ( <i>electron microscopy</i> )
<b>EME1</b>	Endonucleasa meiótica esencial 1 ( <i>essential meiotic endonuclease 1</i> )
<b>EMSA</b>	Ensayo de cambio de movilidad electroforética ( <i>electrophoretic mobility shift assay</i> )
<b>ER</b>	Receptor de estrógenos ( <i>estrogen receptor</i> )
<b>ERCC1</b>	Reparación por escisión intercomplementando la deficiencia en reparación de roedores, grupo de complementación 1 ( <i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i> )
<b>ES</b>	Troncal embrionaria(s) ( <i>embryonic stem</i> )
<b>ESCRT-III</b>	Complejo de clasificación endosómica requerido para el transporte III ( <i>endosomal sorting complex required for transport III</i> )
<b>EXO</b>	Exonucleasa ( <i>exonuclease</i> )
<b>F</b>	Fibra(s)
<b>FACS</b>	Clasificación celular activada por fluorescencia ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
<b>FANC</b>	Anemia de Fanconi ( <i>Fanconi anemia</i> )
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FDR</b>	Tasa de falsos descubrimientos ( <i>false discovery rate</i> )
<b>FFR</b>	Región formadora de focos ( <i>foci-forming region</i> )
<b>FHA</b>	Asociado a Forkhead ( <i>Forkhead-associated</i> )
<b>FISH</b>	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> ( <i>fluorescent in situ hybridization</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>fmol</b>	Femtomo
<b>FPLC</b>	Cromatografía líquida rápida de proteínas ( <i>fast protein liquid chromatography</i> )
<b>FRAP</b>	Recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo ( <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> )
<b>FS</b>	Sitio frágil ( <i>fragile site</i> )
<b>G</b>	Glicina (Gly)
<b>G (base)</b>	Guanina
<b>g/L</b>	Gramo(s) por litro
<b>G0 (fase)</b>	Hueco 0 ( <i>gap 0</i> )
<b>G1 (fase)</b>	Hueco 1 ( <i>gap 1</i> )
<b>G2 (fase)</b>	Hueco 2 ( <i>gap 2</i> )



<b>G4</b>	Cuádruplex-G
<b><math>\gamma</math>-<sup>32</sup>P-ATP</b>	ATP marcado radiactivamente con <sup>32</sup> P en su fosfato en posición $\gamma$
<b><math>\gamma</math>H2AX</b>	Fosforilación de la histona H2AX en Ser <sup>139</sup> (H2AXS139p)
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ) (gen)
<b>GAR</b>	Rico en glicina-arginina ( <i>glycine-arginine rich</i> )
<b>GEF</b>	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina ( <i>guanine nucleotide-exchange factor</i> )
<b>GEN1</b>	Endonucleasa similar a XPG ( <i>XPG-like endonuclease</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>GG-NER</b>	NER global del genoma ( <i>global genome NER</i> )
<b>GIN5</b>	SLD5–PSF1–PSF2–PSF3 (5-1-2-3) ( <i>Go-Ichi-Nii-San</i> , en Japonés)
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GSH</b>	Glutación ( <i>glutathione</i> )
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa ( <i>glutathione S-transferase</i> )
<b>Gy</b>	Gray
<b>H</b>	Histona ( <i>histone</i> )
<b>h</b>	Hora(s)
<b>H15</b>	Histonas de las familias 1 y 5 ( <i>histone families 1 and 5</i> )
<b>H2AK15ub<sub>1</sub></b>	Monoubiquitinación de la histona H2A en Lys <sup>15</sup> (H2AK15 monoubiquitinada)
<b>H<sub>2</sub>O BM</b>	H <sub>2</sub> O de (grado) Biología Molecular
<b>H3K36me<sub>3</sub></b>	Trimetilación de la histona H3 en Lys <sup>36</sup> (H3K36 trimetilada)
<b>H3K79me</b>	Metilación de la histona H3 en Lys <sup>79</sup> (H3K79 metilada)
<b>H4K20me</b>	Metilación de la histona H4 en Lys <sup>20</sup> (H4K20 metilada)
<b>H4K20me<sub>1</sub></b>	Monometilación de la histona H4 en Lys <sup>20</sup> (H4K20 monometilada)
<b>H4K20me<sub>2</sub></b>	Dimetilación de la histona H4 en Lys <sup>20</sup> (H4K20 dimetilada)
<b>H4K20me<sub>3</sub></b>	Trimetilación de la histona H4 en Lys <sup>20</sup> (H4K20 trimetilada)
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferasa ( <i>histone acetyltransferase</i> )
<b>HCS</b>	Escrutinio de alto contenido ( <i>high-content screening</i> )
<b>HDAC</b>	Histona desacetilasa ( <i>histone deacetylase</i> )
<b>hDot1L</b>	Dot1L humana ( <i>human Dot1L</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazín-N'-(2-etanosulfónico) ( <i>N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)</i> )
<b>HhH</b>	Hélice-horquilla-hélice ( <i>helix-hairpin-helix</i> )
<b>His</b>	Histidina
<b>HJ</b>	Estructura de Holliday ( <i>Holliday junction</i> )
<b>HKMT</b>	Histona lisina-metiltransferasa ( <i>histone lysine-methyltransferase</i> )
<b>HMG</b>	Grupo de alta movilidad ( <i>high-mobility group</i> )
<b>HMM</b>	Modelo oculto de Markov ( <i>hidden Markov model</i> )

<b>HMT</b>	Histona metiltransferasa ( <i>histone methyltransferase</i> )
<b>HNPCC</b>	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico ( <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> )
<b>HOD</b>	Dominio de homo-oligomerización ( <i>homo-oligomerization domain</i> )
<b>HP1</b>	Proteína de la heterocromatina 1 ( <i>heterochromatin protein 1</i> )
<b>HR</b>	Recombinación homóloga ( <i>homologous recombination</i> )
<b>HTM</b>	Microscopía de alto rendimiento ( <i>high-throughput microscopy</i> )
<b>ICF</b>	Inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anomalías faciales ( <i>immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies</i> )
<b>ICL</b>	Entrecruzamiento intercatenario ( <i>interstrand crosslink</i> )
<b>ICLR</b>	Reparación de ICLs ( <i>ICL repair</i> )
<b>IDL</b>	Bucle de inserción/delección ( <i>insertion/deletion loop</i> )
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G ( <i>immunoglobulin G</i> )
<b>IL</b>	Interleukina ( <i>interleukin</i> )
<b>IMAGE</b>	Análisis Molecular Integrado de los Genomas y su Expresión ( <i>Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression</i> )
<b>iMEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados ( <i>immortalized mouse embryonic fibroblasts</i> )
<b>INO80</b>	Requiriendo inositol 80 ( <i>inositol-requiring 80</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido ( <i>isopropyl-<math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i> )
<b>IR</b>	Radiación ionizante ( <i>ionizing radiation</i> )
<b>IR (color)</b>	Infrarrojo
<b>IRIF</b>	Focos inducidos por radiación ionizante ( <i>ionizing radiation-induced foci</i> )
<b>IRIF*</b>	Mutante IRIF <sup>D1521R</sup> (IRIF Tudor <sup>D1521R</sup> )
<b>JMJD2A</b>	Conteniendo dominio Jumonji 2A ( <i>Jumonji domain-containing 2A</i> )
<b>K</b>	Lisina (Lys)
<b>KAP-1</b>	Proteína asociada a KRAB 1 ( <i>KRAB-associated protein 1</i> )
<b>KBD</b>	Dominio de unión a cinetocoros ( <i>kinetochore-binding domain</i> )
<b>KD</b>	<i>Knock-down</i>
<b>KDa</b>	Kilodalton(s)
<b>KDM</b>	Lisina-desmetilasa ( <i>lysine-demethylase</i> )
<b>KMT</b>	Lisina-metiltransferasa ( <i>lysine-methyltransferase</i> )
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>KV</b>	Kilovoltio(s)
<b>L-GSH</b>	L-glutación ( <i>L-glutathione</i> )
<b>L3MBTL1</b>	Similar a (3)tumor cerebral maligno 1 ( <i>lethal(3)malignant brain tumor-like 1</i> )
<b>LB</b>	Caldo de lisogenia ( <i>lysogeny broth</i> )
<b>LDS</b>	Dodecilsulfato lítico ( <i>lithium dodecyl-sulphate</i> )
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de la leucemia ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )

---

<b>LIG</b>	ADN ligasa ( <i>DNA ligase</i> )
<b>LMNA</b>	Lámina A ( <i>Lamin A</i> )
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>Lys</b>	Lisina
<b>M</b>	Molar
<b>M (fase)</b>	Mitosis ( <i>mitosis</i> )
<b>MBT</b>	Tumor cerebral maligno ( <i>malignant brain tumor</i> )
<b>MCS</b>	Sitio múltiple de clonación ( <i>multiple cloning site</i> )
<b>MCS-L</b>	Sitio múltiple de clonación-izquierdo ( <i>multiple cloning site-left</i> )
<b>MCS-R</b>	Sitio múltiple de clonación-derecho ( <i>multiple cloning site-right</i> )
<b>MDC1</b>	Mediador del <i>checkpoint</i> de daño en el ADN 1 ( <i>mediator of DNA damage checkpoint 1</i> )
<b>mDDR</b>	DDR del <i>midbody</i> ( <i>midbody DDR</i> )
<b>me</b>	Metilación
<b>MEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón ( <i>mouse embryonic fibroblasts</i> )
<b>MES</b>	Ácido 2-( <i>N</i> -morfolino)-etanosulfónico ( <i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i> )
<b>mg/mL</b>	Miligramo(s) por mililitro
<b>MGMT</b>	O <sup>6</sup> -metilguanina-ADN metiltransferasa ( <i>O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase</i> )
<b>MGS</b>	Síndrome de Meier-Gorlin ( <i>Meier-Gorlin syndrome</i> )
<b>Min</b>	Neoplasia intestinal múltiple ( <i>multiple intestinal neoplasia</i> )
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>MIT</b>	Interacción y tráfico de microtúbulos ( <i>microtubule-interacting and -trafficking</i> )
<b>MKLP1</b>	Proteína similar a la kinesina mitótica 1 ( <i>mitotic kinesin-like protein 1</i> )
<b>mL</b>	Mililitro(s)
<b>mL/min</b>	Mililitro(s) por minuto
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMEJ</b>	Unión de extremos mediada por microhomología ( <i>microhomology-mediated end-joining</i> )
<b>MMR</b>	Reparación de apareamientos erróneos ( <i>mismatch repair</i> )
<b>MMS</b>	Metilmetanosulfonato ( <i>methyl-methanesulfonate</i> )
<b>MMS21</b>	Sensibilidad a MMS 21 ( <i>MMS-sensitivity 21</i> )
<b>MMSET</b>	Mieloma múltiple conteniendo dominio SET ( <i>multiple myeloma SET domain-containing</i> )
<b>Mon</b>	Monómero(s)
<b>MOPS</b>	Ácido 3-( <i>N</i> -morfolino)-propanosulfónico ( <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> )
<b>MRE11</b>	Recombinación meiótica 11 ( <i>meiotic recombination 11</i> )
<b>mRFP</b>	Proteína roja fluorescente monomérica ( <i>monomeric red fluorescent protein</i> )
<b>MRN</b>	MRE11-RAD50-NBS1
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>mass spectrometry</i> )

---

<b>ms</b>	Milisegundo(s)
<b>MSH6</b>	Homólogo de MutS 6 ( <i>MutS homologue 6</i> )
<b>MSI</b>	Inestabilidad de microsatélites ( <i>microsatellite instability</i> )
<b>mSTF</b>	Tampón STF modificado ( <i>modified STF buffer</i> )
<b>MT</b>	Microtúbulos ( <i>microtubules</i> )
<b>µg</b>	Microgramo(s)
<b>µg/mL</b>	Microgramo(s) por mililitro
<b>µL</b>	Microlitro(s)
<b>Mul</b>	Multímero(s)
<b>µM</b>	Micromolar
<b>µm</b>	Micrómetro(s)
<b>MUM1</b>	Antígeno 1 asociado a melanoma mutado ( <i>mutated melanoma-associated antigen 1</i> )
<b>MUS81</b>	Sensible a MMS y UV 81 ( <i>MMS- and UV-sensitive 81</i> )
<b>MWCO</b>	Límite de peso molecular ( <i>molecular weight cut-off</i> )
<b>Nº.</b>	Número de
<b>NBS1</b>	Síndrome de rotura de Nijmegen 1 ( <i>Nijmegen breakage syndrome 1</i> )
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos ( <i>nucleotide excision repair</i> )
<b>ng/mL</b>	Nanogramos por mililitro
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos ( <i>non-homologous end-joining</i> )
<b>NLS</b>	Señal de localización nuclear ( <i>nuclear location/localization signal</i> )
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanómetro(s)
<b>No IR</b>	No irradiado
<b>ns</b>	No significativo
<b>NSD2</b>	Nuclear conteniendo dominio SET 2 ( <i>nuclear SET domain-containing 2</i> )
<b>NSMCE2</b>	Elemento 2 de mantenimiento no-estructural de los cromosomas ( <i>non-structural maintenance of chromosomes element 2</i> )
<b>N<sub>t</sub></b>	Amino-terminal (N-terminal)
<b>nt</b>	Nucleótido(s)
<b>NUP</b>	Nucleoporina ( <i>nucleoporin</i> )
<b>Ø</b>	Control
<b>ø</b>	Diámetro
<b>o/n</b>	Toda la noche ( <i>overnight</i> )
<b>OB</b>	Unión a oligonucleótidos ( <i>oligonucleotide-binding</i> )
<b>OF</b>	Fuera del marco de lectura ( <i>out-of-frame</i> )
<b>OIS</b>	Senescencia inducida por oncogenes ( <i>oncogene-induced senescence</i> )
<b>OPT</b>	Oct-1, PTF, transcripción

---

<b>ORC</b>	Complejo de reconocimiento del origen de replicación ( <i>origin-recognition complex</i> )
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura ( <i>open reading frame</i> )
<b>P</b>	Prolina (Pro)
<b>p</b>	Fosforilación
<b>p</b>	Valor- <i>p</i> ( <i>p-value</i> )
<b>p. ej.</b>	Por ejemplo
<b>p/V</b>	Peso en volumen
<b>P1</b>	<i>Pellet</i> nuclear intacto
<b>P2</b>	<i>Pellet</i> de restos celulares citoplásmicos
<b>P3</b>	Fracción cromatínica/matriz nuclear.
<b>p53</b>	Proteína de 53 KDa ( <i>protein 53 kDa</i> )
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PAR</b>	Poli-(ADP-ribosa)
<b>par</b>	Poli-ADP-ribosilación
<b>PARG</b>	Poli-(ADP-ribosa) glucosidrolasa ( <i>poly-(ADP-ribose) glucosidrolase</i> )
<b>PARP</b>	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa ( <i>poly-(ADP-ribose) polymerase</i> )
<b>PARPi</b>	Inhibidor(es) de PARP ( <i>PARP inhibitor(s)</i> )
<b>PB</b>	Tampón de permeabilización ( <i>permeabilization buffer</i> )
<b>pb</b>	Par(es) de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PBS-T</b>	Tampón PBS–Tween20
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células proliferantes ( <i>proliferating-cell nuclear antigen</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>Pdp1</b>	Proteína conteniendo dominio PWWP 1 ( <i>PWWP domain-containing protein 1</i> )
<b>PES</b>	Poliéter-sulfona ( <i>polyethersulphone</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehído ( <i>paraformaldehyde</i> )
<b>Pfam</b>	Familias de proteínas ( <i>protein families</i> )
<b>PHD</b>	Homeodominio de plantas ( <i>plant homeodomain</i> )
<b>PI</b>	Yoduro de propidio ( <i>propidium iodide</i> )
<b>PICH</b>	Helicasa de <i>checkpoint</i> que interacciona con PLK1 ( <i>PLK1-interacting checkpoint helicase</i> )
<b>PIKK</b>	Kinasa similar a la fosfatidilinositol-3-kinasa ( <i>phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase</i> )
<b>PIP</b>	Péptido de interacción con PCNA ( <i>PCNA-interacting peptide</i> )
<b>PIPES</b>	Ácido piperazín- <i>N,N'</i> -bis(2-etanosulfónico) ( <i>piperazine-<i>N,N'</i>-bis(2-ethanesulfonic acid)</i> )
<b>PLK1</b>	Kinasa similar a Polo 1 ( <i>Polo-like kinase 1</i> )
<b>PLK1i</b>	Inhibidor(es) de PLK1 ( <i>PLK1 inhibitor(s)</i> )
<b>PM</b>	Peso molecular

---

<b>PMEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón primarios ( <i>primary mouse embryonic fibroblasts</i> )
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonio ( <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
<b>PNA</b>	Ácido peptidonucleico ( <i>peptide nucleic acid</i> )
<b>PNK</b>	Polinucleótido kinasa ( <i>polynucleotide kinase</i> )
<b>POL</b>	Polimerasa ( <i>polymerase</i> )
<b>PRMT1</b>	Proteína arginina <i>N</i> -metiltransferasa 1 ( <i>protein arginine N-methyltransferase 1</i> )
<b>PTEMF</b>	Tampón PIPES–Tritón X-100–EGTA–MgCl <sub>2</sub> –paraformaldehído
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno ( <i>polyvinylidene fluoride</i> )
<b>PWCA</b>	Mutante PWWP <sup>W106C+P107A</sup>
<b>PWWP</b>	Prolina-triptófano-triptófano-prolina (Pro-Trp-Trp-Pro)
<b>PWWP<sup>DNMT3B1</sup></b>	Dominio PWWP de DNMT3B1
<b>Q</b>	Glutamina (Gln)
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real ( <i>quantitative real time-PCR</i> ) Retrotranscripción-PCR cuantitativa ( <i>quantitative retrotranscription-PCR</i> )
<b>R</b>	Arginina (Arg)
<b>RAD</b>	Sensible a radiación ( <i>radiation-sensitive</i> )
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RBM10</b>	Motivo de unión a ARN 10 ( <i>RNA-binding motif 10</i> )
<b>RCTD</b>	Región carboxi-terminal al dominio Tudor ( <i>region carboxy-terminal to Tudor domain</i> )
<b>RFP</b>	Proteína roja fluorescente ( <i>red fluorescent protein</i> )
<b>RG</b>	Arginina-glicina (Arg-Gly)
<b>RIPA</b>	Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación ( <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> )
<b>RNAi</b>	Interferencia de ARN ( <i>RNA interference</i> )
<b>RNAP</b>	ARN polimerasa ( <i>RNA polymerase</i> )
<b>RNF</b>	Proteína con dedo RING ( <i>RING-finger protein</i> )
<b>ROI</b>	Región de interés ( <i>region of interest</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RPA</b>	Proteína de replicación A ( <i>replication protein A</i> )
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPOA1</b>	ARN polimerasa ADN-dirigida, subunidad A' ( <i>DNA-directed RNA-polymerase, subunit A'</i> )
<b>RRM</b>	Motivo de reconocimiento de ARN ( <i>RNA-recognition motif</i> )
<b>RS</b>	Estrés replicativo ( <i>replication stress</i> ) ( <i>replicative stress</i> )
<b>RSC</b>	Remodelar la estructura de la cromatina ( <i>remodel the structure of chromatin</i> )
<b>RTel1</b>	Helicasa 1 reguladora de la elongación telomérica ( <i>regulator of telomere elongation helicase 1</i> )
<b>RV</b>	Retrovirus
<b>S</b>	Serina (Ser)
<b>S (fase)</b>	Síntesis ( <i>synthesis</i> )

---

<b>s</b>	Segundo(s)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b><i>S. pombe</i></b>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<b>S1</b>	Sobrenadante citosólico
<b>S2</b>	Fracción citosólica
<b>S3</b>	Fracción nucleoplásmica
<b>SA-β-Gal</b>	β-galactosidasa asociada a senescencia ( <i>senescence-associated β-galactosidase</i> )
<b>SAC</b>	Checkpoint de ensamblaje del huso ( <i>spindle assembly checkpoint</i> )
<b>SAHF</b>	Foco de heterocromatina asociado a senescencia ( <i>senescence-associated heterochromatin focus</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico ( <i>sodium dodecyl-sulphate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS ( <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SDSA</b>	Anillamiento de cadena dependiente de síntesis ( <i>synthesis-dependent strand annealing</i> )
<b>seg</b>	Segundo(s)
<b>SET8</b>	Conteniendo dominio SET 8 ( <i>SET domain-containing 8</i> )
<b>SETD2</b>	Conteniendo dominio SET 2 ( <i>SET domain-containing 2</i> )
<b>shRNA</b>	ARN horquillado corto ( <i>short hairpin RNA</i> )
<b>siRNA</b>	ARN pequeño interferente ( <i>small interfering RNA</i> )
<b>SLX</b>	Letal sintético de función desconocida ( <i>synthetic lethal of unknown function</i> )
<b>SMART</b>	Herramienta de investigación de arquitectura modular simple ( <i>simple modular architecture research tool</i> )
<b>SMC</b>	Mantenimiento estructural de los cromosomas ( <i>structural maintenance of chromosomes</i> )
<b>SNF2</b>	No fermentable de sacarosa 2 ( <i>sucrose non-fermentable 2</i> )
<b>SPAST</b>	Spastina (gen)
<b>SPR</b>	Resonancia de plasmón superficial ( <i>surface plasmon resonance</i> )
<b>SSA</b>	Anillamiento de cadena sencilla ( <i>single-strand annealing</i> )
<b>SSB</b>	Rotura de cadena sencilla ( <i>single-strand break</i> )
<b>SSBR</b>	Reparación de SSBs ( <i>SSB repair</i> )
<b>SSC</b>	Tampón citrato sódico salino ( <i>saline-sodium citrate buffer</i> )
<b>SSDB</b>	Unión a ADN de cadena sencilla ( <i>single-stranded DNA-binding</i> )
<b>ssDNA</b>	ADN de cadena sencilla ( <i>single-stranded DNA</i> )
<b>STED</b>	Microscopía de depleción de emisión estimulada ( <i>stimulated emission depletion microscopy</i> )
<b>su</b>	Sumoilación
<b>SUMO</b>	Modificador pequeño similar a la Ubiquitina ( <i>small ubiquitin-like modifier</i> )
<b>Suv4-20h1,2</b>	Homólogos 1 y 2 del supresor de variegación 4-20 ( <i>suppressor of variegation 4-20 homologues 1 &amp; 2</i> )
<b>SWI</b>	Interruptor ( <i>switch</i> )

---



<b>SWI/SNF</b>	Interruptor/No fermentable de sacarosa ( <i>switch/sucrose non-fermentable</i> )
<b>SWR</b>	Relacionada con Swi2/Snf2 ( <i>Swi2/Snf2-related</i> )
<b>T</b>	Treonina (Thr)
<b>T (base)</b>	Timina
<b>t</b>	Tiempo
<b>TBE</b>	Tampón Tris-Ácido bórico-EDTA ( <i>Tris-Borate-EDTA buffer</i> )
<b>TBS</b>	Tampón Tris salino ( <i>Tris-buffered saline</i> )
<b>TBS-T</b>	Tampón TBS-Tween20
<b>TC-NER</b>	NER acoplado a transcripción ( <i>transcription-coupled NER</i> )
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TLS</b>	Síntesis translesión ( <i>translesion synthesis</i> )
<b>TOPO</b>	Topoisomerasa ( <i>topoisomerase</i> )
<b>TOPO-IIi</b>	Inhibidor(es) de TOPO-II ( <i>TOPO-II inhibitor(s)</i> )
<b>U</b>	Unidad(es)
<b>U (base)</b>	Uracilo
<b>u.f.</b>	Unidades de fluorescencia
<b>U/mL</b>	Unidad(es) por mililitro
<b>ub</b>	Ubiquitinación
<b>UDR</b>	Reclutamiento dependiente de ubiquitinación ( <i>ubiquitination-dependent recruitment</i> )
<b>UFB</b>	Puente de ADN ultrafino ( <i>ultrafine DNA bridge</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltio(s)
<b>V (aa)</b>	Valina (Val)
<b>V/cm</b>	Voltio(s) por centímetro
<b>V/V</b>	Volumen en volumen
<b>VCP</b>	Proteína conteniendo Valosina ( <i>Valosin-containing protein</i> )
<b>VPS4</b>	Clasificación de proteínas vacuolares 4 ( <i>vacuolar protein sorting 4</i> )
<b>W</b>	Triptófano (Trp)
<b>WB</b>	<i>Western blot</i> ( <i>immunoblot</i> )
<b>WCE</b>	Extracto de proteínas celulares totales (extracto proteico total) ( <i>whole-cell extract</i> )
<b>WHSC1</b>	Candidato 1 del síndrome de Wolf-Hirschhorn ( <i>Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1</i> )
<b>WLL</b>	Láser de luz blanca ( <i>white light laser</i> )
<b>wt</b>	<i>Wild type</i> (silvestre(s))
<b>XP</b>	Xerodermia pigmentosa ( <i>xeroderma pigmentosum</i> )
<b>Y</b>	Tirosina (Tyr)
<b>ZnF</b>	Dedo de zinc ( <i>zinc finger</i> )



# ANEXO I



# ANEXO I

## Material suplementario: CD-ROM

En la cubierta posterior se adjunta un CD-ROM conteniendo el siguiente material suplementario dentro de las carpetas correspondientes:

- **Figuras:** Se incluyen todas las figuras usadas, en formato de imagen JPEG de alta resolución. Recomendado para su visualización detallada.
- **Videos:** Contiene los tres vídeos a los que se hace referencia en el texto.
- **Bibliografía:** Accesos directos a los enlaces en la base de datos bibliográfica *PubMed* de cada una de las referencias bibliográficas citadas en el texto, ordenadas según autor y año.
- **Tesis:** Versión electrónica de esta tesis doctoral, en formato PDF.





## **ANEXO II**





# ANEXO II

## Artículo publicado:

Santos MA, Huen MS, Jankovic M, Chen HT, López-Contreras AJ, Klein IA, Wong N, **Barbancho JL**, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig MC, Chen J, Nussenzweig A (2010).

**Class switching and meiotic defects in mice lacking the E3 ubiquitin ligase RNF8.**

*J Exp Med* **207**(5):973-81.

